

Die Rolle von regulatorischen T-Zellen bei der experimentellen Arthritis der Maus

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Oliver Hendrik Frey**

geboren am 22. April 1975 in Erfurt

15. Juni 2004

Erster Gutachter: Prof. Dr. R. Bräuer, Jena

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. T. Kamradt, Jena

Dritter Gutachter: Prof. Dr. F. Emmrich, Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung:

04. Januar 2005

Abkürzungsverzeichnis

AIA	Antigen-induzierte Arthritis
AP	Alkalische Phosphatase
APZ	antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
BSA	bovines Serumalbumin
CCL	C-Chemokin-Ligand
CCP	zitruelliniertes zyklisches Peptid (<i>engl.</i> : citrullinated cyclic peptide)
CCR	C-Chemokin-Rezeptor
CD	cluster of differentiation
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvans (<i>engl.</i> : complete Freund's adjuvant)
CFSE	(5,6)-Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis (<i>engl.</i> : collagen-induced arthritis)
ConA	Concanavalin A
cpm	counts per minute
CTLA	cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen
CXCL	CX-Chemokin-Ligand
CXCR	CX-Chemokine-Rezeptor
Cy5	Indocarbocyanin 5
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> : desoxyribonucleic acid)
DTH	verzögerte Überempfindlichkeit (<i>engl.</i> : delayed type hypersensitivity)
DZ	Dendritische Zelle
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immunosorbent spot
F(ab)	fragment antigen binding
FACS	fluorescence-activated cell sorting
Fc	fragment cristallizable
FCS	Fetales Kälberserum (<i>engl.</i> : fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FI	Fluoreszenz
FoxP3	forkhead-winged helix protein 3
FPLC	fast protein liquid chromatography
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>engl.</i> : forward scatter)

GITR	glucocorticoid-induced TNF receptor
GPI	Glukose-6-Phosphat-Isomerase
HLA	humanes Leukozytenantigen
HSP	Hitzeschockprotein
HSV	Herpes-Simplex-Virus
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LAP	latency-associated protein
LK	Lymphknoten
MACS	magnetic-activated cell sorting
mAk	monoklonaler Antikörper
MBP	myelin basic protein
mBSA	methyliertes bovines Serumalbumin
M ϕ	Makrophage
MHC	major histocompatibility complex
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	Multiple Sklerose
NOD	non obese diabetes
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.</i> : phosphate buffered saline)
PE	R-Phycoerythrin
PGIA	Proteoglykan-induzierte Arthritis
PPD	purified protein derivate
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RA	Rheumatoide Arthritis
RAG	recombination activating gene
RF	Rheumafaktor
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
SCID	severe combined immunodeficiency
SF	Synovialflüssigkeit
SFB	synovialer Fibroblast
SLE	systemischer Lupus erythematoses

SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>engl.</i> : side scatter)
STAT	signal transducer and activator of transcription
TGF- β	transforming growth factor- β
T _h -Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TREC	T cell receptor excision circle
T _{reg} -Zelle	regulatorische T-Zelle
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
TZR	T-Zell-Rezeptor
ZAP	zeta-associated protein

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
INHALTSVERZEICHNIS	IV
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1 Die rheumatoide Arthritis	3
2.1.1 Ätiologie und Pathogenese	3
2.1.2 Diagnostik und Therapie der RA	4
2.2 Experimentelle Arthritismodelle	7
2.2.1 Allgemeines	7
2.2.2 Die Antigen-induzierte Arthritis	7
2.2.3 Andere Arthritismodelle	11
2.3 Regulatorische T-Zellen (T_{reg} -Zellen)	12
2.3.1 Allgemeines	12
2.3.2 Adaptive und natürlich vorkommende T_{reg} -Zellen	12
2.3.3 Natürlich vorkommende $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen	14
2.3.4 $CD103^- (\alpha_E\beta_7^-)$ exprimierende T_{reg} -Zellen	21
2.4 Zusammenfassung und Fragestellung	23
3 MATERIALIEN UND METHODEN	24
3.1 Geräte und Materialien	24
3.1.1 Geräte	24
3.1.2 Materialien	24
3.1.3 Chemikalien	25
3.1.4 Verwendete Kulturmedien, Lösungen und Puffer	27
3.1.5 Verwendete Antikörper	30
3.2 Versuchstiere und Arthritisinduktion	31
3.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	31
3.2.2 Immunisierung und Arthritisinduktion	31
3.2.3 Beurteilung der Schwere der Arthritis	31
3.3 Behandlung mit anti-CD25-Antikörper	33
3.3.1 Herstellung und Aufreinigung des Antikörpers	33

3.3.2	<i>Aufreinigung</i>	34
3.3.3	<i>Behandlungsschema</i>	35
3.4	Zelltransfer	35
3.4.1	<i>Zellisolation</i>	35
3.4.2	<i>Präaktivierung und Transfer</i>	37
3.5	Messung der zellulären Immunreaktivität	37
3.5.1	<i>Verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion</i>	37
3.5.2	<i>Untersuchung der zellulären Immunreaktivität in vivo</i>	38
3.6	Messung der humoralen Immunreaktivität	40
3.6.1	<i>mBSA- und knorpelmatrixspezische Antikörper</i>	40
3.6.2	<i>Immunglobulin-Subklassen</i>	41
3.7	Untersuchungen zum Migrationsverhalten von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Zellen	41
3.8	Zytokin-ELISA	42
3.9	Durchflusszytometrie	43
3.10	Darstellung der Ergebnisse und statistische Analyse	45
4	ERGEBNISSE	46
4.1	Depletion von CD25-positiven Zellen <i>in vivo</i>	46
4.1.1	<i>Stärke und Dauer der Depletion</i>	46
4.1.2	<i>Effekt auf die Arthritisschwere</i>	47
4.1.3	<i>Beeinflussung der zellulären und humoralen Immunantwort</i>	48
4.1.4	<i>Zusammenfassung</i>	53
4.2	Transfer von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Zellen	55
4.2.1	<i>Transfer von frisch isolierten Zellen</i>	56
4.2.2	<i>Transfer von CD4⁺CD25⁺ Zellen aus immunisierten Tieren</i>	57
4.2.3	<i>Transfer von präaktivierten CD4⁺CD25⁺ Zellen</i>	59
4.2.4	<i>Zusammenfassung</i>	63
4.2.5	<i>Beeinflussung der zellulären und humoralen Immunreaktivität</i>	63
4.2.6	<i>Untersuchungen zum Migrationsverhalten von CD4⁺CD25⁺ Zellen</i>	68
4.2.7	<i>Zusammenfassung</i>	70
4.3	Transfer von $\alpha_E\beta_7$ -exprimierenden regulatorischen T-Zell-Subsets	71
4.3.1	<i>Effekt auf die Arthritisschwere</i>	71
4.3.2	<i>Migrationsverhalten von $\alpha_E\beta_7$-exprimierenden T_{reg}-Subsets</i>	74
4.3.3	<i>Zusammenfassung</i>	76

5	DISKUSSION	77
5.1	Depletionsexperimente	79
5.2	Transfer von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Zellen	84
5.3	Migration von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Zellen <i>in vivo</i>	87
5.4	Transfer von $\alpha_E\beta_7$ -exprimierenden T _{reg} -Subsets	89
5.5	Regulatorische T-Zellen und Autoimmunerkrankungen des Menschen	93
6	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	97
7	LITERATURVERZEICHNIS	99
8	ANHANG	122
	Lebenslauf	122
	Danksagung	126
	Ehrenwörtliche Erklärung	127

1. Zusammenfassung

In den letzten Jahren ist das Konzept wiederbelebt worden, dass T-Zell-Antworten von spezialisierten T-Zellen mit regulatorischen/suppressiven Eigenschaften (T_{reg} -Zellen) kontrolliert werden. Die Entdeckung, dass CD4-positive ($CD4^+$) T-Zellen, die konstitutiv die α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) exprimieren, eine solche regulatorische T-Zell-Subpopulation (T_{reg} -Zelle) sind, war daran wesentlich beteiligt. Diese T_{reg} -Zellen stellen eine natürlich vorkommende T-Zellpopulation in der Maus, in Ratten und im Menschen dar. Sie proliferieren *in vitro* nach Stimulation ihres T-Zell-Rezeptors nicht und können über noch unzureichend bekannte, zellkontaktabhängige Mechanismen die Proliferation andere T-Zellen hemmen.

In verschiedenen Tiermodellen ist gezeigt worden, dass T_{reg} -Zellen die Entstehung von Autoimmunkrankheiten verhindern können. Ob, und wenn ja, welchen Einfluss sie auf die Pathogenese der chronischen Arthritis haben, war bisher unbekannt und wurde in der vorliegenden Arbeit im Modell der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) der Maus untersucht. Die AIA ist ein T-Zell-abhängiges Modell einer chronischen Arthritis, die durch die intraartikuläre Injektion eines Proteinantigens (methyliertes bovines Serumalbumin; mBSA) in spezifisch sensibilisierten Tieren ausgelöst wird.

Zur Untersuchung der Rolle von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen wurden CD25-exprimierende Zellen durch Injektion eines monoklonalen anti-CD25 Antikörpers *in vivo* depletiert. Diese Depletion führte zu einer klinisch und histologisch nachweisbaren Exazerbation der Arthritis. Begleitet war diese exazerbierte Arthritis in CD25-depletierten Tieren von einer erhöhten antigenspezifischen zellulären und humoralen Immunreaktivität gegen das verwendete Antigen mBSA und gegen knorpelmatrixspezifische Autoantigene. Diese Erhöhung der Immunreaktivität ist als Ursache der stärkeren AIA in diesen Tieren anzusehen.

Mit Transferexperimenten, bei denen $CD4^+CD25^+$ Zellen aus naiven oder immunisierten Donoren zum Zeitpunkt der AIA-Induktion in die Rezipienten adoptiv transferiert wurden, konnte die wichtige Rolle solcher Zellen bei der Regulation der Arthritis bestätigt werden. So konnte die Schwere der Arthritis durch den Transfer von 2×10^5 *in vitro* präaktivierter Zellen deutlich supprimiert werden. Bei den Untersuchungen der systemischen mBSA-spezifischen Immunantworten fand sich überraschenderweise keine Suppression in den Rezipienten von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen, verglichen mit $CD4^+CD25^-$ Zellen oder PBS. Da die T_{reg} -Zellen die

Proliferation anderer T-Zellen *in vitro* über zellkontaktabhängige Mechanismen unterdrücken können, kann die Lokalisation dieser Zellen *in vivo* für ihren suppressiven Effekt wichtig sein. Deswegen wurde das Migrationsverhalten dieser Zellen *in vivo* mit radioaktiv- oder fluorochrom-markierten Zellen untersucht. Tatsächlich waren $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen in der Lage, den drainierenden Lymphknoten, aber auch direkt das entzündete Gelenk zu erreichen. Um zu untersuchen, ob der Suppression im drainierenden Lymphknoten oder im Effektororgan eine größere Bedeutung zukommt, wurden die T_{reg} -Zellen anhand des Integrins $\alpha_E\beta_7$ in weitere Subsets sortiert. $CD4^+CD25^+\alpha_E\beta_7^-$ T_{reg} -Zellen besitzen einen naiven Phänotyp ($CD62L^{high}$, $CCR7^+$) und ein entsprechendes Migrationsverhalten (Rezirkulation über sekundäre Lymphorgane). Im Gegensatz dazu besitzen $CD4^+CD25^+\alpha_E\beta_7^+$ T_{reg} -Zellen, aber auch $CD4^+CD25^-\alpha_E\beta_7^+$ T_{reg} -Zellen, einen Effektor/Memory-Zell-ähnlichen Phänotyp (verschiedene Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren für inflammatorische Chemokine) und können direkt in entzündete Gebiete einwandern. Beide $\alpha_E\beta_7$ -exprimierenden Subsets waren besser als $CD4^+CD25^+\alpha_E\beta_7^-$ T_{reg} -Zellen in der Lage, die AIA zu unterdrücken. Dies korrelierte mit einem besseren Homing beider $\alpha_E\beta_7^+$ Subsets im entzündeten Gelenk, was durch Migrationsuntersuchungen mit radioaktiv markierten Zellen nachgewiesen wurde. Somit scheint einer Suppression der Arthritis direkt im entzündeten Gebiet eine größere Bedeutung zuzukommen als im drainierenden Lymphknoten.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob durch den Transfer von $CD4^+CD25^+$ oder $CD4^+\alpha_E\beta_7^+$ T_{reg} -Subsets eine bereits etablierte Arthritis therapeutisch beeinflusst werden kann. Ein solcher therapeutischer Effekt konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Es ist zu vermuten, dass die transferierten T_{reg} -Zellen unter den inflammatorischen Bedingungen der etablierten Arthritis ihren suppressiven Effekt nicht ausüben können.

Insgesamt zeigen diese Untersuchungen, dass regulatorische T-Zellen an der Regulation der Schwere der chronischen Arthritis beteiligt sind. Da solche T_{reg} -Zellen auch im Menschen vorkommen, könnte es möglich sein, dass eine Beeinträchtigung der Zahl oder Funktion dieser Zellpopulation für das Auftreten und/oder die Chronifizierung von Autoimmunerkrankungen verantwortlich ist.

2. Einleitung

2.1 Die rheumatoide Arthritis

2.1.1 Ätiologie und Pathogenese

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist die häufigste chronisch-entzündliche Krankheit aus dem Formenkreis der rheumatischen Erkrankungen. Sie befällt zirka 1% der Menschen in der westlichen Welt, unter denen wiederum bevorzugt Frauen betroffen sind (75%). Die RA verursacht durch ihren chronischen Verlauf, ihre schwierige und aufwendige Behandlung und das Auftreten von destruktiven Veränderungen der betroffenen Gelenke, die mit Funktionseinschränkungen oder -verlust einhergehen, hohe Kosten in den Gesundheitssystemen. Allein die direkten Kosten werden mit 10.000 US\$ pro Jahr und Patient angegeben (Michaud et al. 2003).

Bei der RA handelt es sich um eine entzündliche Systemerkrankung, die bevorzugt die kleinen Gelenke der Hand (mit Ausnahme der distalen Interphalangealgelenke) und des Fußes befällt. Histologisch findet sich eine Trias aus synovialer Hyperplasie, entzündlicher Infiltration und Gelenkdestruktion. Insbesondere die Gelenkdestruktion ist fortschreitend und führt in Endstadien der Erkrankung zu den klinisch eindrucksvollen Gelenkdeformitäten. Extraartikuläre Manifestation wie zum Beispiel Rheumaknoten, Peri- oder Myokarditis, Vaskulitis oder Vergrößerungen der Lymphknoten und Milz kommen vor und sind mit einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert (Gabriel et al. 2003).

Trotz großer Bemühungen sind Ätiologie und Pathogenese der RA nach wie vor nur unvollständig verstanden. Offensichtlich spielen Autoimmunreaktionen von T- und B-Lymphozyten eine maßgebliche Rolle in der Pathogenese der RA (VanderBorghet et al. 2001). Aus solchen Zellen besteht der Großteil des entzündlichen Infiltrates in der Synovialmembran und dafür spricht das gehäufte Auftreten der RA in Patienten, die die HLA-Gene DRB1*0401, DRB1*0404 oder DRB1*0101 besitzen. Interessanterweise findet man in der dritten hypervariablen Region der DR β -Kette all dieser HLA-Moleküle eine gemeinsame Sequenz, das sogenannte „shared epitope“. Da diese Sequenz nicht zum antigenbindenden Teil des HLA-Moleküls gehört, ist ihre Bedeutung für die Antigenpräsentation und damit die Initiation autoreaktiver Prozesse jedoch unklar (Gonzalez-Gay et al. 2002). Auch das Auftreten von Autoantikörpern wie Rheumafaktoren oder anti-CCP (anti-citrullinated cyclic peptide)

bereits Jahre vor der klinischen Manifestation der RA unterstreicht eine wichtige Rolle solcher Autoimmunreaktionen (Rantapaa-Dahlqvist et al. 2003). Die Möglichkeit einer Heilung der chronischen Arthritis durch eine myeloablative Konditionierung mit anschließender autologer Stammzelltransplantation, wodurch ein naives Immunsystem wiederhergestellt wird, ist ebenfalls ein gewichtiges Argument für eine autoaggressive Pathogenese der RA (Verburg et al. 2002).

Andererseits sind synoviale Fibroblasten und Makrophagen, die Matrix-metalloproteinasen und proinflammatorische Zytokine produzieren, unzweifelhaft die Effektorzellen der Gelenkdestruktion (Kinne et al. 2000, Kramer et al. 2003). Umstritten ist jedoch, wie es zu einer Aktivierung dieser Zellen kommt, die über eine Proliferation oder gestörte Apoptose zur Hyperplasie der Synovialmembran führt. Vereinzelt werden Transformationen durch Virusinfekte verantwortlich gemacht (Müller-Ladner et al. 1998), wahrscheinlicher ist aber eine Aktivierung dieser Zellen durch direkte oder zytokinvermittelte Interaktionen mit T-Lymphozyten oder anderen Immunzellen. Das geringe Vorkommen von T-Zell-Zytokinen in der RA-Synovialmembran lässt vermuten, dass der direkten Stimulation über Zellkontakt hierbei eine entscheidende Rolle zukommt (Burger 2000, McInnes et al. 2000). Es muss wohl davon ausgegangen werden, dass die komplexen Interaktionen und die wechselseitige Beeinflussung der beteiligten Zellsysteme, die letztendlich zur Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung und damit zur Gelenkzerstörung führen, bisher nur ansatzweise verstanden sind.

2.1.2 Diagnostik und Therapie der RA

Die Diagnose der RA wird anhand des Vorliegens der 1987 revidierten Kriterien der American Rheumatism Association gestellt (Arnett et al. 1988).

1. Morgensteifigkeit der Gelenke, länger als 1 Stunde
2. Weichteilschwellung in mehr als 3 Gelenken
3. Schwellung (Arthritis) der proximalen interphalangealen, der metakarpophalangealen oder der Handgelenke
4. Symmetrische Schwellung (Arthritis)
5. Rheumaknoten
6. Nachweis von Rheumafaktor
7. Röntgenologisch Erosionen oder gelenknahe Osteoporose in Finger- oder Handgelenken

Für die Diagnose einer sicheren RA müssen mindestens 4 Kriterien vorhanden sein und die Symptome 1-4 sollen über mindestens 6 Wochen andauern. Allerdings ist eine frühzeitige Diagnosestellung der RA damit nicht möglich. Dies wird aber zunehmend wichtiger, da die Gelenkdestruktion in Frühphasen der RA besonders progressiv verläuft und man heute hofft, durch eine frühestmögliche effektive Therapie diese irreversible Gelenkdestruktion zu verhindern. Der Goldstandard zur Erkennung von sehr frühen Stadien der RA ist die Magnetresonanztomographie. Mit dieser Untersuchungsmethode ist es möglich, frühe Stadien der Synovitis und fröheosive Veränderungen der Gelenkstrukturen zu detektieren (Tehranzadeh et al. 2003). Es bleibt allerdings abzuwarten, ob sich diese zeit- und personalaufwendige und damit sehr teure Untersuchung in der klinischen Routine durchsetzen kann. Neue bildgebende Verfahren unter Benutzung von Autofluoreszenz von entzündeten Geweben oder molekulare Bildgebung mittels Nah-Infrarotlicht könnten deshalb zukünftig eine wichtige Bedeutung für die Frühdiagnose der RA erlangen (Hansch et al. 2003, 2004).

Die wichtigste Basis der Behandlung der RA ist die medikamentöse Therapie. Hierbei kommen Präparate mit verschiedenen Wirkprinzipien zum Einsatz: Zur symptomatischen Linderung der Schmerzen und der Entzündung kommen nichtsteroidale antiinflammatorische Medikamente (wie zum Beispiel Ibuprofen, Indomethacin etc.) zum Einsatz, die durch eine Hemmung der Cyclooxygenase (COX) die Prostaglandinsynthese hemmen. Als vorteilhaft bezüglich der Rate der gastrointestinalen Nebenwirkungen bei gleicher Wirksamkeit hat sich die selektive Hemmung der COX-2 durch die neue Substanzklasse der Coxibe herausgestellt (Hochberg 2002).

Eine zweite wichtige Gruppe, die sogenannten Basistherapeutika, die eine heterogene Gruppe verschiedenster Substanzen umfassen, können den Krankheitsverlauf der RA verlangsamen. Beispiele für solche Basistherapeutika sind Leflunomid, Goldpräparate (Aurothiomalat, Auranofin), D-Penicillamin, Antimalariamittel (Chloroquin, Hydroxychloroquin), Sulfasalazin, Azathioprin und Cyclosporin A. Der bedeutenste Vertreter aus dieser Gruppe ist jedoch das Methotrexat, das am häufigsten eingesetzt wird, am besten verträglich und am raschesten wirksam ist und daher von den Patienten am längsten eingenommen werden kann. Die exakten Wirkmechanismen dieser Medikamente sind nur teilweise

bekannt und umfassen zytotoxische Wirkungen, Hemmung lysosomaler Enzyme und Immunsuppression. Durch diese pleiotropen Wirkungen besteht eine erhebliche Toxizität dieser Medikamente, die eine strenge Therapieüberwachung erforderlich macht (Gabriel et al. 2001, Aletaha und Smolen 2002).

Glukokortikoide werden im akuten Schub, aber auch zur chronischen Therapie (als low-dose Therapie) der RA eingesetzt (van Everdingen et al. 2003).

Die neueste Medikamentengruppe zur Behandlung der RA sind die sogenannten Biologicals; Proteine, die beispielsweise die Wirkung körpereigener proinflammatorischer Zytokine blockieren. Als erstes eingeführt und von hoher klinischer Wirksamkeit hat sich die Hemmung der Wirkungen des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α) erwiesen (Paleolog 2003). Zur Neutralisation dieses Zytokins kommen chimäre oder voll humane monoklonale anti-TNF- α -Antikörper (Infliximab oder Adalumimab) sowie TNF-Rezeptor-Fc-Fusionsproteine (Etanercept) zum Einsatz. Als fast ebenso wirksam hat sich die Neutralisation von Interleukin-1 β (IL-1 β) durch rekombinanten IL-1-Rezeptor-Antagonisten (Anakinra) erwiesen. Es bleibt abzuwarten, ob bestimmte Subpopulationen von RA-Patienten besonders von einer der Therapieprinzipien oder der Kombination beider profitieren können. Allerdings kann es durch die Neutralisation dieser wichtigen Zytokine auch zu einer Reaktivierung einer Tuberkulose sowie generell zu einer gesteigerten Infektionsanfälligkeit kommen.

Neuere Ansätze, die sich noch im Stadium der klinischen Erprobung befinden, sind die Neutralisation von IL-6 und IL-15 (Choy et al. 2002, McInnes et al. 2003).

Aktuelle Studien mit dem anti-CD20 Antikörper Rituximab in RA-Patienten haben gezeigt, dass auch durch die Depletion von B-Zellen der Verlauf der RA signifikant beeinflusst werden kann (De Vita et al. 2002).

Nichtmedikamentöse Therapieverfahren der RA umfassen eine Reduktion der Menge der entzündeten Synovialmembran, entweder durch offene Operation oder Arthroskopie beziehungsweise durch die intraartikuläre Injektion von Radionukliden (Radiosynoviorthese mit $^{90}\text{Yttrium}$, $^{169}\text{Erbium}$ oder $^{186}\text{Rhenium}$) (Nakamura et al. 2000, Fischer und Modder 2002) oder chemischer Substanzen. Diese verschiedenen Synovektomieverfahren können den Verlauf der RA signifikant beeinflussen, ihre Anwendung ist aber limitiert. Gründe hierfür sind zum einen das Operationstrauma,

andererseits macht das typische Muster der RA, ein Befall vieler kleiner Gelenke, ein solches Vorgehen häufig unmöglich. Ebenso ist der wiederholte Einsatz der Radiosynoviorthese durch das Ausschwemmen der Isotope aus dem Gelenk mit der Folge des Auftretens von chromosomalen Abberationen in Blutlymphozyten limitiert (Gumpel und Stevenson 1975).

2.2 Experimentelle Arthritismodelle

2.2.1 Allgemeines

Experimentelle Arthritismodelle sind für die Rheumaforschung nach wie vor unverzichtbar. Dies hat verschiedene Gründe: Zum einen ist nahezu nichts über initiale Schritte der Pathogenese der RA bekannt, die sich möglicherweise Monate oder Jahre vor der klinischen Manifestation der Erkrankung abspielen. Zum anderen handelt es sich bei Untersuchungsmaterial (z.B. Synovialmembran) häufig um Material, dass bei operativen Eingriffen gewonnen wird. Solche Eingriffe, wie zum Beispiel Gelenkersatzoperationen oder Synovektomien, werden aber nur in fortgeschrittenen Stadien oder bei therapierefraktärer Erkrankung durchgeführt. Außerdem sind diese Patienten fast alle mit Antirheumatika behandelt worden.

Obwohl Erkenntnisse aus Tierexperimenten nur begrenzt auf die Situation im Patienten übertragen werden können, erlauben sie doch ein besseres Verständnis von Teilaspekten der humanen Erkrankung, insbesondere von initialen Pathogeneseschritten der chronischen Arthritis und das Testen von neuen therapeutischen Prinzipien. Im folgenden sollen daher einige dieser Modelle genauer beschrieben werden.

2.2.2 Die Antigen-induzierte Arthritis

Die Antigen-induzierte Arthritis (AIA) wurde erstmals 1962 von Dumonde und Glynn im Kaninchenmodell beschrieben (Dumonde und Glynn 1962) und später von Brackertz als Mausmodell adaptiert, kann aber auch in Ratten, Meerschweinchen und Schafen induziert werden (Brackertz et al. 1977a, 1977b, 1977c, Bräuer et al. 1994, Highton et al. 1999). Prinzipiell werden die Versuchstiere mit einer subkutanen Injektion eines Gemisches aus einem Proteinantigen und einem immunstimulierenden Adjuvans immunisiert. Die Arthritis wird anschließend durch die intraartikuläre Injektion desselben Antigens in das Kniegelenk induziert. Als Antigen können verschiedene Proteine (Fibrin, Albumin) dienen, allerdings ist für eine

Chronifizierung der AIA eine langdauernde Persistenz des Antigens im Gelenk notwendig. Diese Persistenz erreicht man durch die Verwendung von kationischen Proteinen, die an der negativ geladenen Knorpelmatrix binden. Solche Proteine sind zum Beispiel methyliertes Rinderserumalbumin (mBSA) oder kationisiertes Ovalbumin.

Durch die intraartikuläre Antigeninjektion kommt es dort zu einer Immunkomplexreaktion (Arthusreaktion), die zu einer Exsudation von Fibrin und Neutrophilen Granulozyten führt. Das histologische Bild dieser akuten Phase der Arthritis ist das einer typischen akuten Entzündung (Abb. 1B). Allerdings ist bereits diese akute Phase der AIA von $CD4^+$ T-Zellen abhängig, wie Depletionsexperimente mit monoklonalen Antikörpern gegen CD4 (Pohlers et al. 2004) und gegen CD3 (eigene, bisher unpublizierte Ergebnisse) gezeigt haben.

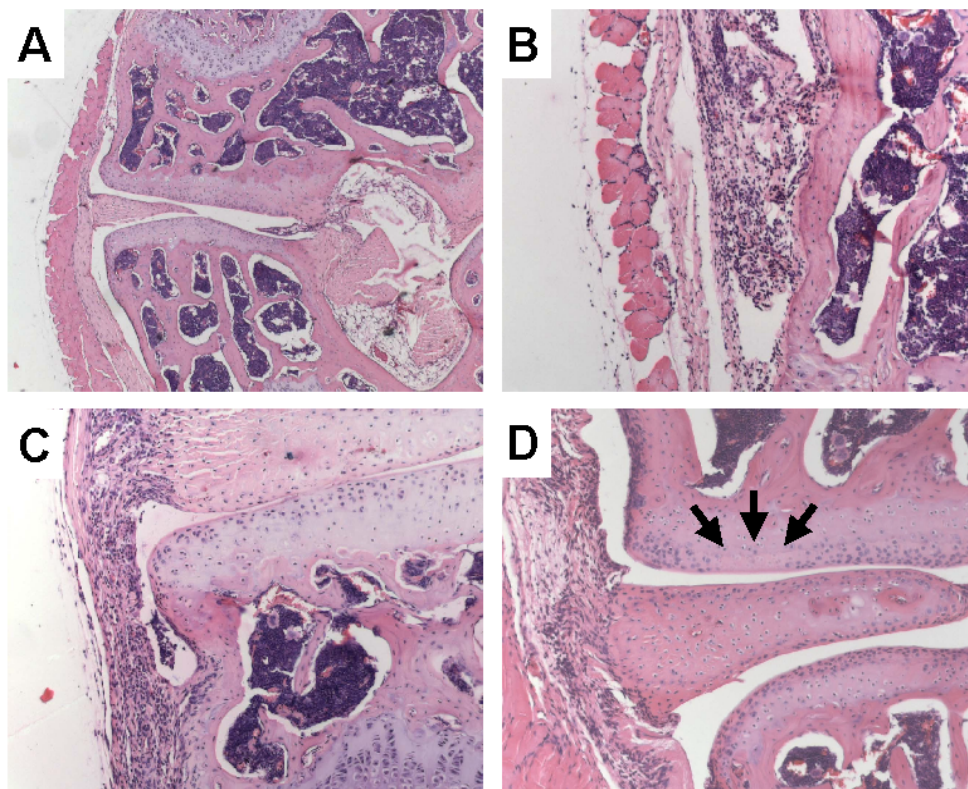


Abbildung 1: Histologisches Erscheinungsbild der AIA zu verschiedenen Zeitpunkten der Krankheit. (A) Normales Kniegelenk. In der akuten Krankheitsphase 1 Tag (d1) nach der intraartikulären Antigeninjektion (B) dominiert ein Exsudat aus Fibrin und Neutrophilen Granulozyten im Gelenkspalt. In der frühen chronischen Phase (d 7, C) kommt es zu einer mononukleären Infiltration der Synovialmembran, die bis in das chronische Stadium (d 21, D) persistiert. Zusätzlich kommt es zu einer zunehmenden Gelenkdestruktion in Form von Knorpelnekrosen (Pfeile).

Im weiteren Verlauf wandelt sich das histologische Bild der betroffenen Gelenke, das entzündliche Exsudat geht zurück und dafür kommt es zu einer Infiltration der

Synovialmembran mit mononukleären Zellen sowie zu einer Aktivierung des Mesothels mit konsekutiver Hyperplasie der ansonsten kaum sichtbaren Mesothelzellen (Abb. 1C).

In der chronischen Phase der AIA verringert sich das Entzündungsinfiltrat und die synoviale Hyperplasie wiederum, aber es kommt zu einer progredienten Gelenkdestruktion, die über Monate persistiert (Abb. 1D).

CD4⁺ T-Zellen sind für die Pathogenese der AIA unerlässlich, wie die oben erwähnten Depletionsstudien und Transferexperimente (Petrov et al. 1996b) gezeigt haben. Üblicherweise werden T-Helfer-1 (T_h1) -Antworten für das Auftreten von makrophagenvermittelten gewebsdestruktiven Prozessen verantwortlich gemacht (im Gegensatz zu immunglobulinvermittelten Krankheiten wie Allergien und Asthma, für die T_h2-Zellen verantwortlich gemacht werden). Dieses einfache Konzept scheint jedoch im Falle der AIA nicht zutreffend zu sein, weil sowohl T_h1- als auch T_h2-Zellen pathogenetische Bedeutung besitzen (Simon 2000). Zwar sind T_h1-Zellen *in vitro* besser in der Lage, Makrophagen zu aktivieren (Lehmann 2002). Ihre Fähigkeit, die Zytokin- und Proteasesekretion synovialer Fibroblasten zu stimulieren, ist jedoch geringer als das von T_h2-Zellen (Hückel 2003). Weiterhin ist die AIA in Mäusen, die genetisch defizient für IL-4 oder IL-10 sind, nicht dramatisch exazerbiert, was ebenso gegen eine protektive Rolle von T_h2-Zellen in diesem Modell spricht. Darüber hinaus können CD4⁺ T-Zellen, die kein IFN- γ produzieren (IFN- γ ⁻), im adoptiven Transfer eine stärkere Arthritis induzieren als IFN- γ ⁺ T_h-Zellen (Simon 2000) und es kommt zu einer deutlichen Exazerbation der AIA in IFN- γ -defizienten Mäusen. Solche protektiven Effekte von IFN- γ wurden auch in anderen Entzündungs- und Autoimmunmodellen beschrieben (Matthys et al. 2000).

Durch die Immunisierung mit mBSA in komplettem Freund'schen Adjuvans kommt es nicht nur zu einer massiven Expansion von mBSA-spezifischen T-Zellen und zum Auftreten von mBSA-spezifischen Immunglobulinen, sondern auch zum Auftreten von zellulärer und humoraler Autoimmunität gegen Knorpelmatrixbestandteile (Kollagen Typ I und Typ II sowie Proteoglykane). Diese Autoimmunreaktionen sind für die Chronifizierung der Arthritis wichtig (Bräuer et al. 1988, 1993, 1994, Petrov et al. 1996a).

Die AIA ist nicht streng MHC-restringiert und kann daher in fast allen Mausstämmen,

auch in transgenen beziehungsweise knockout-Stämmen, induziert werden. Lediglich CBA-Mäuse sind für die AIA nichtsuszeptibel, weil sich ihnen keine ausreichende zelluläre und humorale Immunreaktivität gegen mBSA induzieren lässt (Brackertz et al. 1977a, Simon 2000).

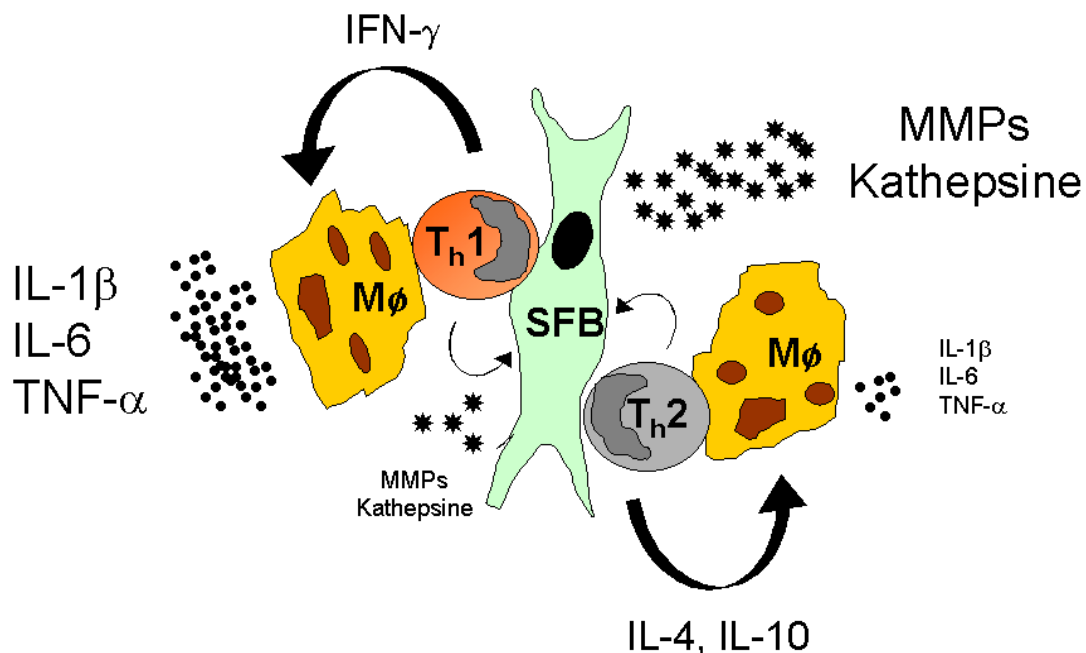


Abbildung 2: Zelluläre Interaktionen in der entzündeten AIA-Synovialmembran. Th1- und Th2-Zellen stimulieren Makrophagen (Mφ) und synoviale Fibroblasten (SFB) zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und matrixdegradierenden Enzymen wie zum Beispiel Matrixmetalloproteinasen (MMPs) oder Kathepsine.

Die Antigen-induzierte Arthritis ist das einzige bekannte Arthritismodell, bei dem durch lokale oder systemische Antigengabe eine akute, die chronische Entzündung überlagernde, Exazerbation der Arthritis ausgelöst werden kann (Lens et al. 1986, Buchner et al. 1995). Diese akuten Exazerbationen ähneln den akuten Schüben der RA. Weitere Vorteile der AIA sind ihre 100%ige Inzidenz, der gleichzeitige Beginn in allen Versuchstieren und ihr relativ uniformer Zeitverlauf, der therapeutische Manipulationen zu definierten Krankheitszeitpunkten ermöglicht.

Diese Vorteile des experimentellen Systems und Ähnlichkeiten im histologischen Bild (Trias aus Entzündung, synovialer Hyperplasie und Gelenkdestruktion) zwischen AIA und RA sowie die ähnliche therapeutische Beeinflussbarkeit machen die Antigen-induzierte Arthritis zu einem wichtigen und akzeptierten Arthritismodell.

2.2.3 Andere Arthritismodelle

Experimentelle Arthritismodelle können prinzipiell in induzierte und spontan auftretende unterteilt werden. Beispiele für induzierte Arthritiden sind das Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) oder der Proteoglykan-induzierten Arthritis (PGIA), die jeweils durch Immunisierung von suszeptiblen Mausstämmen mit Kollagen Typ II oder Proteoglykan in Freund'schem Adjuvans entstehen. Durch diese Immunisierung kommt es zum Auftreten von humoralen und zellulären Autoimmunreaktionen gegen diese Knorpelmatrixbestandteile, die zur Entstehung einer Polyarthritis führen (Luross und Williams 2001, Glant et al. 2003). Insbesondere die CIA ist ein weit verbreitetes und häufig verwendetes experimentelles Arthritissystem. Sowohl CIA als auch PGIA haben den Nachteil einer variablen Krankheitsinzidenz und -beginns, der sowohl vom verwendeten Mausstamm (oder Substamm), der Herkunft des Antigens und exogenen Faktoren (z.B. Tierhaltung) abhängt (Brebant et al. 1993, Brand et al. 1996, Glant et al. 2001).

Weitere Beispiele für induzierbare Arthritismodelle sind die Adjuvansarthritis der Ratte (van Eden und Waksman 2003; induziert durch Immunisierung mit komplettem Freund'schen Adjuvans ohne Antigen), die Streptokokkenzellwand-induzierte Arthritis (Kimpel et al. 2002) sowie Arthritiden, die durch Injektion von Zymosan oder Pristan induziert werden können (Keystone et al. 1977, Vingsbo et al. 1996)

Spontan auftretende Arthritiden gibt es beispielsweise in der MRL-*lpr/lpr* Maus (Koopman und Gay 1988) und in Mäusen, die humanen TNF- α überexprimieren (Li und Schwarz 2003). Erst kürzlich wurde ein Mausstamm beschrieben, bei dem es aufgrund einer Mutation im ZAP-70-Gen zu einer gestörten Selektion von T-Zellen im Thymus kommt. Diese Mäuse entwickeln ein der RA histologisch sehr ähnliches Krankheitsbild, bei dem es sogar zum Auftreten von Rheumafaktoren und extraartikulären Manifestationen kommt (Sakaguchi et al. 2003).

Ein ebenfalls neues und sehr interessantes Modell einer Spontanarthritis ist das Modell der K/BxN-Maus. Diese Mäuse sind das Ergebnis einer Kreuzung aus Tieren mit transgenem T-Zell-Rezeptor (TZR) mit NOD- (non-obese diabetes-) Mäusen. Der transgene TZR ist spezifisch für ein Epitop einer bovinen RNase, kreuzreagiert aber mit der ubiquitär vorkommenden Glukose-6-Phosphat-Isomerase (GPI; Kyburz und Corr 2003). Sie entwickeln ab dem Alter von 3 Wochen eine schwere Arthritis, die T- und B-Zell-abhängig ist. Der Transfer von Serum aus arthritischen Tieren allein ist

ausreichend, eine Arthritis in Rezipienten zu induzieren (Ji et al. 2002, Maccioni et al. 2002). Für die Pathogenese dieser Arthritis sind Fc γ -Rezeptoren (besonders Fc γ RIII) (Corr und Crain 2002) und Komplementfaktoren (C3, C5, Faktor B) absolut unerlässlich (Ji et al. 2002). Eine Arthritis kann ebenfalls durch den Transfer von monoklonalen anti-GPI-Antikörpern (Maccioni et al. 2002) oder durch Immunisierung mit GPI induziert werden (Berner et al. 2003, Schubert et al. 2004). Die Entdeckung des K/BxN Arthritismodells, das allein durch Immunkomplexreaktionen ausgelöst werden kann, hat auch zu einer Renaissance der Immunkomplextheorie der RA geführt. Allerdings ist ein Zusammenhang zwischen anti-GPI-Antikörpern und RA eher zweifelhaft (Schubert et al. 2002, Herve et al. 2003), aber eine Mitbeteiligung anderer Autoantikörper (Rheumafaktoren, anti-CCP, anti-Kollagen Typ II, anti-HSP etc.) und der Erfolg der anti-CD20-Therapie unterstützen dieses Konzept. Dieses Wiederaufleben eines Pathogenesekonzeptes, „induziert“ durch ein neues Tiermodell, belegen den hohen Nutzen experimenteller Arthritismodelle.

2.3 Regulatorische T-Zellen (T_{reg}-Zellen)

2.3.1 Allgemeines

Die Existenz von Lymphozyten, die darauf spezialisiert sind, Immunreaktionen zu unterdrücken, wurde bereits in den 70er Jahren durch Arbeiten von Gershon postuliert (Gershon und Kondo 1971). Allerdings gelang es damals nicht, diese Zellen anhand eines spezifischen Markers zu isolieren und auch der Mechanismus der Suppression blieb unklar. Die Beschreibung der funktionellen Dichotomie (T_h1/T_h2) der T-Zellen, die sich wechselseitig regulieren können (Mosmann et al. 1986), führte dann zur völligen Ablehnung des Konzeptes der Suppressor-T-Zelle und dieser Terminus verschwand aus dem Wörterbuch der Immunologie.

2.3.2 Adaptive und natürlich vorkommende T_{reg}-Zellen

Dennoch wurde in den letzten Jahren eine ganze Reihe von T-Helfer-Zell-Subsets identifiziert, die in der Lage sind, das Auftreten von Autoimmunerkrankungen *in vivo* sowie T-Zellfunktionen *in vitro* zu inhibieren. Konzeptionell werden derzeit natürlich vorkommende und adaptive regulatorische T-Zellen voneinander unterschieden (Bluestone und Abbas 2003). Natürlich vorkommend bedeutet in diesem Zusammenhang, dass solche Zellen als Bestandteil eines normalen Immunsystems in gesunden Individuen existieren. Im Gegensatz dazu werden adaptive T_{reg}-Zellen in

der Peripherie durch Stimulation mit Antigen unter bestimmten Stimulationsbedingungen aus reifen T-Zellen generiert.

Ein Prototyp der natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen stellen offensichtlich CD4⁺ Zellen dar, die konstitutiv die α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) exprimieren. Adaptive regulatorische T-Zellen können durch tolerogene Antigenapplikation *in vivo* (meist über mukosale Oberflächen, z.B. oral oder nasal) oder durch wiederholte Stimulation von naiven T-Zellen in Gegenwart von IL-10 *in vitro* induziert werden (Groux et al. 1997, Thorstenson und Khoruts 2001, Unger et al. 2003a, 2003b). Auch die Injektion von antigenbeladenen tolerogenen DZ führt zur Induktion oder Expansion von adaptiven T_{reg}-Zellen, die dann wiederum über die Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen wie IL-10 oder TGF- β Immunantworten antigenspezifisch inhibieren können (Menges et al. 2002, Martin et al. 2003, Sato et al. 2003, Wakkach et al. 2003). Interessanterweise nutzen Pathogene solche Mechanismen als Evasionstrategie vor der Immunabwehr. So können beispielsweise *Bordetella pertussis*-Keime oder Cholera toxin über eine Triggerung der IL-10-Produktion in DZ und daraus resultierender Induktion von regulatorischen T-Zellen eine pathogenspezifische T_H1-Antwort unterdrücken (McGuirk et al. 2002, Lavelle et al. 2003).

Eine protektive Rolle dieser adaptiven T_{reg}-Zellen wurde im Modell der CD45RB^{high} T-Zell-induzierten sowie bakterieller Kolitis, in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), in der Transplantattoleranz und in der Verhinderung von experimentellem Diabetes demonstriert (Powrie et al. 1993, Morrissey und Charrier 1994, Davies et al. 1999, Kullberg et al. 2002, Menges et al. 2002, Oida et al. 2003, Uraushihara et al. 2003, Stephens und Mason 2000, Graca et al. 2002b, Trani et al. 2003).

Derzeit ist nicht bekannt, in welcher Beziehung adaptive und natürlich vorkommende T_{reg}-Zellen zueinander stehen. Es ist einerseits möglich, dass natürlich vorkommende T_{reg}-Zellen direkte Vorläufer der adaptiven regulatorischen T-Zellen sind. Eine andere Möglichkeit ist, dass natürlich vorkommende T_{reg}-Zellen aktiv an der Generierung von adaptiven regulatorischen T-Zellen beteiligt sind (infektiöse Toleranz). Im Humansystem können CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen *in vitro* durch direkte T-Zell-T-Zell-interaktionen regulatorische Funktionen in naiven T-Helfer-Zellen induzieren. Diese induzierten T-Helfer/Suppressor-Zellen können wiederum naive T-Zellen über IL-

10/TGF- β -abhängige Mechanismen hemmen (Dieckmann et al. 2002, Jonuleit et al. 2002). Die Bedeutung dieser Beobachtung *in vivo* ist unbekannt. Unklar ist weiterhin auch, ob ein solcher Mechanismus in anderen Spezies, wie zum Beispiel der Maus, überhaupt existiert. So können adaptive alloantigen-spezifische T_{reg}-Zellen im Maussystem auch in Abwesenheit von natürlich vorkommenden T_{reg}-Zellen induziert werden (Karim et al. 2004). Andere Autoren hingegen beschrieben eine Beteiligung von natürlich vorkommenden T_{reg}-Zellen an der Induktion von adaptiven T_{reg}-Zellen *in vivo* (Feunou et al. 2003).

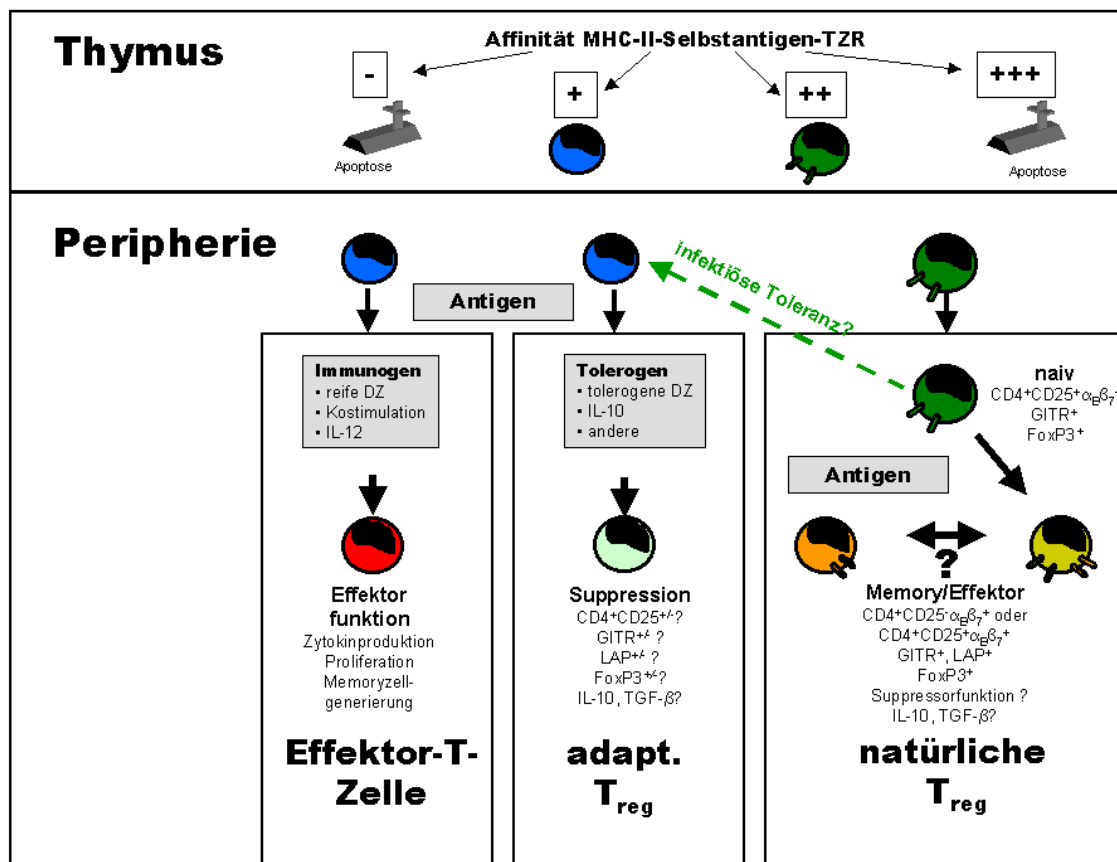


Abbildung 3: Natürlich vorkommende T_{reg}-Zellen (grün) verlassen den Thymus als „fertige“ CD4⁺CD25⁺ $\alpha\beta\gamma$ ⁺ Zellen und reifen in der Peripherie zu Effektor/Memory-T_{reg}-Zellen (CD25⁺ oder CD25⁻, $\alpha\beta\gamma$ ⁺). Konventionelle T-Zellen (blau) verlassen den Thymus und können durch Antigenstimulation unter tolerogenen Bedingungen zu adaptiven T_{reg}-Zellen werden.

2.3.3 Natürlich vorkommende CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen

Das Konzept von Suppressor- oder regulatorischen T-Zellen wurden vorwiegend durch die Arbeiten von Sakaguchi et al. (1995) wiederbelebt. Er identifizierte erstmals eine regulatorische T-Zellpopulation anhand eines spezifischen Markers. So führte der adoptive Transfer von Milz- und Lymphknotenzellen, aus denen zuvor alle CD25-exprimierenden Zellen entfernt wurden, in athymischen Rezipienten zu histologisch

und serologisch evidenten Autoimmunerkrankungen. In weiteren Experimenten wurde demonstriert, dass organspezifische Autoimmunerkrankungen, die nach Thymektomie neugeborener Mäuse entstehen, darauf zurückzuführen sind, dass in diesen Tieren keine $CD4^+CD25^+$ Zellen in der Peripherie vorhanden sind. Werden $CD4^+CD25^+$ Zellen aus normalen Tieren isoliert und dann in neonatal thymektomierte Tiere transferiert, verhindern sie das Entstehen dieser Autoimmunerkrankungen (Suri-Payer et al. 1998). Diese Experimente lassen vermuten, dass $CD4^+CD25^+$ Zellen wie normale T-Zellen aus dem Thymus stammen und tatsächlich wurde später gezeigt, dass T_{reg} -Zellen durch eine hochaffine Interaktion ihres TZR mit Selbstantigenen, das von MHC-Klasse-II-positiven kortikalen Epithelzellen des Thymus präsentiert wird, den Prozess der positiven Selektion im Thymus durchlaufen und diesen als „fertige“ Suppressor-Zelle verlassen (Abb. 3; Itoh et al. 1999, Apostolou et al. 2002, Kawahata et al. 2002, Suto et al. 2002).

Eine stabiler Pool von T_{reg} -Zellen im peripheren Immunsystem wird durch ihre hohe Proliferationsrate unter steady-state-Bedingungen *in vivo* (Fisson et al. 2003) und durch eine periphere Konversion von naiven $CD4^+CD25^-$ T-Zellen zu $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen aufrechterhalten. An dieser Expansion oder peripheren Generierung von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen sind IL-2 und TGF- β beteiligt (Chen et al. 2003, Peng et al. 2004). Es existieren keine oder weniger $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen in der Peripherie von Mäusen, die genetisch defizient für IL-2, die IL-2-Rezeptor- α - und β -Kette (Almeida et al. 2002, Furtado et al. 2002, Malek et al. 2002), die kostimulatorischen Moleküle CD28 (Salomon et al. 2000, Montagnoli et al. 2002, Tang et al. 2003) und CD40 (Kumanogoh et al. 2001) und den Transkriptionsfaktor STAT-5 (Antov et al. 2003) sind. All diesen Molekülen gemeinsam ist eine Beteiligung an der Rezeptorbindung und Signaltransduktion von IL-2 oder der Steuerung seiner Produktion und in all diesen Tieren kommt es aufgrund des Fehlens von T_{reg} -Zellen zu Autoimmunsyndromen, die teilweise tödlich verlaufen.

Dass $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen eine wichtige Rolle bei der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen spielen, wurde auch in anderen Tiermodellen bestätigt. $CD4^+CD25^+$ Zellen verhindern die Induktion einer Autoimmungastritis durch autoantigen- (H/K-ATPase-) spezifische T-Zellen (Suri-Payer et al. 1998). Ebenso wird die Kolitis, die durch den Transfer von $CD4^+CD45^{RB^{high}}$ T-Zellen in T- und B-Zell-defiziente SCID- oder RAG-2-knockout-Mäuse entsteht, durch den gleichzeitigen

Transfer von CD4⁺CD25⁺ Zellen verhindert (Read et al. 2000, Suri-Payer und Cantor 2001). Obwohl CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen vorwiegend Autoantigene erkennen (Kawahata et al. 2002, Romagnoli et al. 2002, Suto et al. 2002), spielen sie auch eine Rolle in der Regulation von Immunantworten gegen bakterielle, virale und parasitäre Infektionen (Aseffa et al. 2002, Belkaid et al. 2002, Kullberg et al. 2002, Kursar et al. 2002, Raghavan et al. 2003, Suvas et al. 2003, Xu et al. 2003). Sie sind ebenfalls wichtig bei der Toleranz von Transplantaten (Hara et al. 2001, Taylor et al. 2001, J. L. Cohen et al. 2002, Graca et al. 2002a, 2002b, Hoffmann et al. 2002, Kingsley et al. 2002) und bei der Antwort gegen Superantigene (Papiernik et al. 1998, Pontoux et al. 2002, Feunou et al. 2003, Grundstrom et al. 2003). CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen unterdrücken nicht nur pathologische Immunreaktionen, die durch CD4⁺ T_h-Zellen vermittelt wird, sondern kontrollieren auch CD8⁺ T-Zellen (Piccirillo und Shevach 2001, Camara et al. 2002, Chai et al. 2002, Kursar et al. 2002, Murakami et al. 2002, Green et al. 2003) sowie Zellen der angeborenen Immunität (Maloy et al. 2003).

Die Entdeckung von CD4⁺CD25⁺ Zellen mit gleichen Eigenschaften und Phänotyp in Ratten und Menschen zeigt, dass diese Zellen einen essentiellen, evolutionär konservierten Beitrag zur Aufrechterhaltung peripherer Toleranz und zur Verhinderung von Autoimmunität leisten (Stephens und Mason 2000, Baecher-Allan et al. 2001, Dieckmann et al. 2001, Jonuleit et al. 2001, Levings et al. 2001, Ng et al. 2001, Stephens et al. 2001, Yamagiwa et al. 2001, Wing et al. 2002).

CD25 ist nicht der einzige Marker, der CD4⁺ Zellen mit regulatorischen Eigenschaften im Immunsystem naiver Mäuse identifizieren kann. Auch die Expression des Integrins $\alpha\text{E}\beta_7$ (CD103) sowie von glucocorticoid-induced TNF-receptor (GITR), latency-associated protein (LAP) oder die niedrige Expression von CD45RB („CD45RB^{low}“) kennzeichnet CD4⁺ T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* (Powrie et al. 1993, Morrissey und Charrier 1994, Davies et al. 1999, Lehmann et al. 2002, Banz et al. 2003, Oida et al. 2003, Uraushihara et al. 2003, Huehn et al. 2004). Diese Marker sind allerdings nicht exklusiv auf einzelnen Subsets exprimiert, sondern diese Subsets überlappen sich partiell. GITR⁺, $\alpha\text{E}\beta_7$ ⁺ und LAP⁺ T_{reg}-Zellen können sowohl CD25⁻ als auch CD25⁺ sein (Lehmann et al. 2002, McHugh et al. 2002, Shimizu et al. 2002, Banz et al. 2003, Oida et al. 2003, Uraushihara et al. 2003, Huehn et al. 2004). Auch CD45RB^{low} CD4⁺ Zellen mit

regulatorischen Eigenschaften können $CD25^-$ als auch $CD25^+$ sein (Asseman et al. 2003). Zusätzlich sind ca. 70% der LAP^+ Zellen gleichzeitig auch $\alpha_E\beta_7^+$ (H. Weiner, persönliche Mitteilung), so dass anzunehmen ist, dass diese beiden T_{reg} -Subset weitgehend identisch sind.

Bislang ist erst ein definitiver Marker beschrieben worden, der absolut spezifisch für natürlich vorkommende T_{reg} -Zellen ist. Analysen von Patienten mit IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) oder scurfy-Mäusen (die ein ähnliches Autoimmunsyndrom wie Patienten mit IPEX entwickeln) haben gezeigt, dass hier Mutationen im Gen des Transkriptionsfaktors forkhead winged helix protein 3 (FoxP3) vorliegen. Diese Spontanmutation führt, ebenso wie die gezielte Mutagenese in FoxP3-knockout-Mäusen, zu einer Defizienz von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen und damit zu einem Autoimmunsyndrom (Fontenot et al. 2003).

Zusätzlich führt die retrovirale Transfektion von naiven T-Zellen mit FoxP3 zu deren Konversion zu Zellen mit einem T_{reg} -Zell-ähnlichen Phänotyp ($CD25^+$, $GITR^+$, $\alpha_E\beta_7^+$, $CTLA-4^+$) und Funktion (geringe Proliferation, Suppression der Proliferation anderer T-Zellen, geringe Zytokinproduktion; Hori et al. 2003). Die transgene Überexpression von FoxP3 führt in Mäusen zu einer Erhöhung der Anzahl der $CD4^+CD25^+$ und $GITR^+$ T_{reg} -Zellen (Khattari et al. 2003). FoxP3 ist daher ein essentielles Regulatorgen für die Zelldifferenzierung hin zu regulatorischen T-Zellen, ähnlich wie T-bet für T_H1 - (Szabo et al. 2000) oder GATA-3 für T_H2 -Zellen (Ranganath et al. 1998).

Die Stimulation von $CD4^+CD25^-$ -T-Zellen in Gegenwart von TGF- β führt zur Induktion der FoxP3-Expression und zu ihrer Konversion hin zu regulatorischen $CD4^+CD25^+$ Zellen ($CD45RB^{low}$, $CTLA-4^+$) (Chen et al. 2003).

Allerdings wird im Humansystem FoxP3 aktivierungsabhängig in naiven T-Zellen exprimiert (Walker et al. 2003b). Somit ist auch dieses Molekül, zumindest beim Menschen, nicht absolut spezifisch für natürlich vorkommende T_{reg} -Zellen.

Unklar ist derzeit, was der genaue molekulare Mechanismus der T_{reg} -Suppression ist. Erste Einblicke kamen aus der Beobachtung, dass diese Zellen nach Stimulation ihres TZR's *in vitro* nicht proliferieren und wenig oder keine Zytokine (insbesondere kein IL-2) produzieren. Weiterhin können $CD4^+CD25^+$ Zellen in einem Kokultursystem die Proliferation von $CD4^+CD25^-$ Zellen hemmen. An dieser Proliferationshemmung

ist eine unterdrückte Produktion von IL-2 in den $CD4^+CD25^-$ T-Zellen beteiligt (Thornton und Shevach 1998, Kuniyasu et al. 2000, de la Rosa et al. 2003). Für diese Proliferationshemmung ist direkter Zellkontakt zwischen T_{reg}^- und den supprimierten Zellen notwendig, wie durch die Verhinderung des direkten Kontaktes durch Einsatz von Transwell™-Einsätzen gezeigt wurde (Takahashi et al. 1998, Thornton und Shevach 2000). Lösliche immunsuppressive Faktoren wie Zytokine scheinen dagegen keine oder nur eine geringe Rolle zu spielen. Die Proliferationshemmung von $CD4^+CD25^-$ Zellen durch T_{reg}^- -Zellen lässt sich nicht durch blockierende Antikörper gegen IL-10 aufheben (Takahashi et al. 1998, Thornton und Shevach 2000). Umstritten ist eine mögliche Rolle von TGF- β : durch hohe Dosen anti-TGF- β oder rekombinantes LAP lässt sich die Proliferationshemmung aufheben (Nakamura et al. 2001, 2004). Andere Autoren haben wiederum gezeigt, dass sich auch $CD4^+CD25^-$ Zellen mit einem dominant negativen TGF- β -Rezeptor-II (dnTGF- β RII) oder aus SMAD3-knockout-Mäusen (die beide nicht TGF- β -responsibel sind), durch $CD4^+CD25^+$ T_{reg}^- -Zellen supprimieren lassen. Zusätzlich sind $CD4^+CD25^+$ Zellen aus TGF- β -knockout-Mäusen ebenso suppressiv wie $CD4^+CD25^+$ Zellen aus Wildtyp-Tieren (Piccirillo et al. 2002).

Unklar ist auch die Rolle des kostimulatorischen Moleküls cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4; CD152). Dieses Molekül wird konstitutiv von $CD4^+CD25^+$ Zellen exprimiert (Read et al. 2000, Takahashi et al. 2000). CTLA-4 kann, wie CD28, B7-Moleküle auf Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) binden, allerdings mit höherer Affinität. Daher wäre es möglich, dass T_{reg}^- -Zellen und normale T-Zellen um diese Moleküle auf der Oberfläche von APZ konkurrieren. Weiterhin könnte CTLA-4 negativ regulierend auf die T_{reg}^- -Zellen wirken und so zu deren anergen Verhalten beitragen (Takahashi et al. 1998). Zusätzlich können $CD4^+CD25^+$ T_{reg}^- -Zellen über CTLA-4-B7-Interaktionen das Enzym Indoleamin-2,3-dioxygenase in Dendritischen Zellen aktivieren. Dieses Enzym verstoffwechselt Tryptophan und die Depletion dieser Aminosäure wiederum hat einen immunsuppressiven Effekt auf T-Lymphozyten (Fallarino et al. 2003). Die Ergebnisse einer Blockade von CTLA-4 mit Antikörpern im Kokulturassay sind uneinheitlich, die Mehrheit der Autoren schließt jedoch eine Mitbeteiligung dieses Moleküls aus. Die Tatsache, dass die Suppression von T-Zellen durch T_{reg}^- -Zellen auch ohne die Anwesenheit von APZ möglich ist (Ermann et al. 2001), ist ein zusätzliches Argument gegen eine Rolle von CTLA-4.

Ein weiterer möglicher Mechanismus der T_{reg} -Funktion könnte Konkurrenz um Wachstumsfaktoren sein. Ein Kandidat für solch einen Mechanismus stellt IL-2 dar. Hohe Dosen exogenes IL-2 oder die Erhöhung der endogenen IL-2-Produktion durch anti-CD28-Antikörper können die Proliferation von $CD4^+CD25^+$ Zellen wiederherstellen und die Suppression verringern (Thornton und Shevach 1998). Da $CD4^+CD25^+$ Zellen selbst kein IL-2 produzieren und die Sekretion von IL-2 von $CD4^+CD25^-$ Zellen verringern (Thornton und Shevach 1998, de la Rosa et al. 2003), wäre es möglich, dass der Konsum von IL-2 durch T_{reg} -Zellen einen Weg der Proliferationshemmung darstellt. In einem chimären Kokultursystem aus murinen $CD25^+$ T_{reg} -Zellen und humanen $CD4^+CD25^-$ Zellen konnte gezeigt werden, dass eine selektive Blockade des IL-2-Rezeptors der $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen durch monoklonale Antikörper oder rekombinantes murines IL-2 den suppressiven Effekt auf die humanen Responderzellen aufhebt (de la Rosa et al. 2003). Auch die essentielle Rolle von IL-2 für die Entstehung und Aufrechterhaltung eines stabilen Pools von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen *in vivo* stützen diese Hypothese.

Eine dritte Möglichkeit stellt die Existenz von noch unbekannten oder wenig charakterisierten inhibitorischen Molekülen dar. Es gibt erste Hinweise darauf, dass Mitglieder der Notch-Familie an der Funktion oder Induktion von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen beteiligt sind. Notch ist eine Familie evolutionär konservierter Transmembranproteine, die eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Geweben und auch bei der Differenzierung von T-Zell-Vorläufern zu $\alpha\beta$ - oder $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen spielen. Transgene Überexpression des Notch-Liganden Jagged-1 in antigenbeladenen APZ führt zur Induktion von regulatorischen T-Zellen aus naiven T-Zellen (Hoyne et al. 2000). Antigen-spezifische T-Zellen, die mit dem Notch-Liganden Delta-1 transfiziert wurden, können benachbarte T-Zellen direkt über Notch-1-Delta-1-Interaktionen hemmen (Hoyne et al. 1999). Für humane $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen wurde eine Überexpression von Notch-4 und Molekülen, die an dessen Signaltransduktion beteiligt sind, beschrieben (Ng et al. 2001). In murinen $CD4^+CD25^+$ Zellen wird Notch-3 exprimiert, und die transgene Überexpression einer konstitutiv aktiven intrazellulären Domäne dieses Moleküls in Mäusen kann die Zahl der T_{reg} -Zellen in diesen Tieren erhöhen und das Auftreten von Streptozotizin-induziertem Diabetes verhindern (Anastasi et al. 2003).

Während *in vitro* offensichtlich nur Zellkontakt für die Suppression erforderlich ist, werden *in vivo* andere Mechanismen vermutet. Die inhibitorische Wirkung von T_{reg} -Zellen auf die Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Kolitis sowie Transplantatabstoßung lässt sich durch Injektion von anti-CTLA-4 aufheben (Read et al. 2000, Takahashi et al. 2000, Liu et al. 2001, 2003, Kingsley et al. 2002). Zusätzlich gibt es *in vivo* auch zytokinvermittelte (IL-10, TGF- β) Mechanismen, wie Studien mit blockierenden Antikörpern oder die Verwendung von dnTGF- β RII-transgenen Mäusen gezeigt haben (Annacker et al. 2001, Hara et al. 2001, Noel et al. 2001, Suri-Payer und Cantor 2001, Kingsley et al. 2002, Asseman et al. 2003, Green et al. 2003, Liu et al. 2003, Maloy et al. 2003).

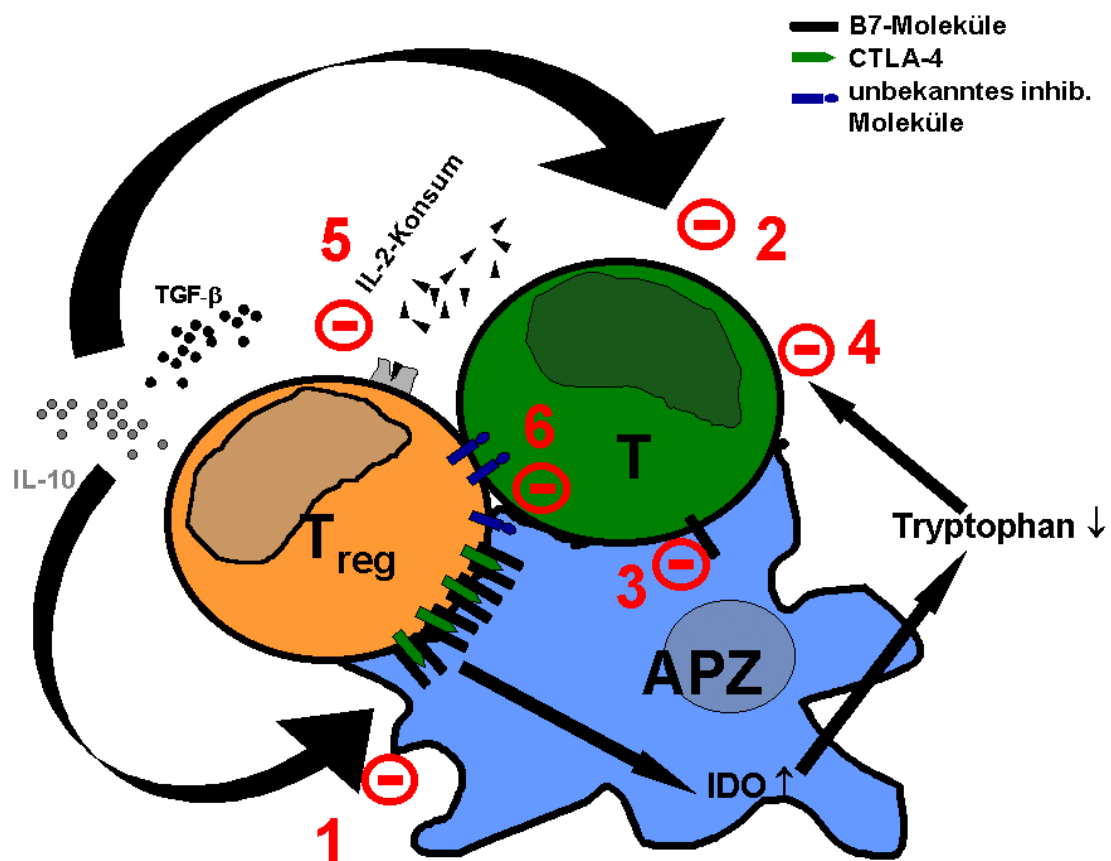


Abbildung 4: Verschiedene Mechanismen sind an der suppressiven Aktivität von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen *in vitro* und *in vivo* beteiligt. Sie umfassen die Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie IL-10 oder TGF- β , die entweder über eine Hemmung von APZ (1) oder direkt die Aktivierung anderer T-Zellen (2) hemmen können. Weiterhin können T_{reg} -Zellen mit anderen T-Zellen um die kostimulatorischen Moleküle auf APZ konkurrieren und damit deren Aktivierung inhibieren (3). T_{reg} -Zellen können über CTLA-4-B7-Interaktionen die Aktivität der Indoleamin-2,3-Deoxygenase (IDO) erhöhen und somit über eine Modulation des Tryptophanmetabolismus Immunantworten inhibieren (4). Ebenfalls beschrieben wurde eine Konkurrenz um IL-2 (5) und direkte oder indirekte inhibitorische Moleküle, z.B. der Notch-Familie (6).

Allerdings gibt es auch Berichte, die eine Rolle von Zytokinen bei *in-vivo*-Effekten von T_{reg} -Zellen ausschließen (Takahashi et al. 1998, Thornton und Shevach 2000,

Levings et al. 2001, Piccirillo et al. 2002). Ein möglicher Grund für diese Diskrepanzen zwischen *in-vivo*- und *in-vitro*-Befunden kann darin liegen, dass regulatorische CD4⁺CD25⁺ T-Zellen unter *in-vivo*-Bedingungen sowohl als Antwort auf homöostatische Signale als auch auf TZR-Stimulation (Immunisierung mit Antigen oder transgenen gewebspezifisch exprimierten Antigenen) gut proliferieren (Gavin et al. 2002, Hori et al. 2002b, Klein et al. 2003, Walker et al. 2003a, Yamazaki et al. 2003). Auch unter steady-state-Bedingungen teilt sich bereits ein großer Teil der CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen (Fisson et al. 2003). Dies kann auch den aktivierten Phänotyp von frisch isolierten T_{reg}-Zellen erklären (CD25⁺, CTLA-4⁺, CD45RB^{low}, partiell CD62L^{low}, CD44^{high}). Auch unter *in-vitro*-Bedingungen können CD4⁺CD25⁺ Zellen mit der gleichen Kinetik wie CD4⁺CD25⁻ Zellen proliferieren, wenn sie mit reifen DZ stimuliert werden (Yamazaki et al. 2003). All diese aktuellen Daten stellen den Wert des Kokultursystems aus T_{reg}-Zellen, Responder-T-Zellen und APZ (üblicherweise T-Zell-depletierte Milzzellen, die zum größten Teil einen unreifen Phänotyp aufweisen) für Untersuchungen zum Suppressionsmechanismus der T_{reg}-Zellen mehr als nur in Frage (Tabelle 1).

Tabelle 1: Vergleich der postulierten Effektorfunktionen der T_{reg}-Zellen *in vivo* und *in vitro*

Eigenschaften/Mechanismus der T _{reg} -Zellen	in vivo	in vitro
Proliferation	+++	-(+)
Hemmung der Proliferation von CD25 ⁻ Zellen	+++	+++
zellkontaktabhängig	?	+++
IL-2-Konsum	?	+
TGF-β	+/-	-(+)
IL-10	+/-	-
CTLA-4	+	-(+)
Wirkung auf APZ	?	-(+)

2.3.4 CD103- (αEβ₇-) exprimierende T_{reg}-Zellen

Das Integrin αEβ₇ (CD103) kann die CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen in CD4⁺CD25⁺αEβ₇⁺ beziehungsweise CD4⁺CD25⁺αEβ₇⁻ T_{reg}-Zellen unterteilen und darüber hinaus CD4⁺CD25⁻αEβ₇⁺ Zellen mit regulatorischen Eigenschaften identifizieren (Lehmann et al. 2002, McHugh et al. 2002, Banz et al. 2003, Huehn et al. 2004). *In vitro* und *in vivo* sind die αEβ₇-exprimierenden Zellen potentere Suppressoren als CD25⁺αEβ₇⁻ Zellen (Lehmann et al. 2002, McHugh et al. 2002, Banz et al. 2003). Globale Genexpressionsanalysen dieser Zellen mit Oligonukleotid-Arrays haben gezeigt,

dass Moleküle, die mit Effektor/Memory-Zell-Funktionen und Migrationsverhalten assoziiert sind, in den $\alpha_E\beta_7$ -exprimierenden T_{reg} -Zellen überexprimiert werden (Huehn et al. 2004; Abb. 5). Dementsprechend werden in sehr jungen Mäusen keine $\alpha_E\beta_7$ -exprimierenden T_{reg} -Zellen gefunden, sondern diese treten erst in älteren Tieren auf (Shimizu und Moriizumi 2003, Huehn et al. 2004). Auch der geringere Gehalt an T cell receptor excision circles (TRECs) in $\alpha_E\beta_7$ -exprimierenden Zellen zeigt, dass es sich um antigenerfahrene Zellen handelt, die sich bereits mehrfach geteilt haben (Huehn et al. 2004). TRECs sind DNA-Fragmente, die beim Rearrangement der TZR-Gene ausgeschnitten werden und stabil in der Zelle verbleiben. Weil sie in reifen Zellen nicht neugebildet werden und dadurch bei jeder Zellteilung verdünnt werden, können sie Aufschluss über das Proliferationsverhalten der T-Zellen liefern (Hazenbergh et al. 2001). Es ist also anzunehmen, dass die T_{reg} -Zellen den Thymus als naive $CD4^+CD25^+\alpha_E\beta_7^-$ Zellen verlassen, in der Peripherie proliferieren (möglicherweise als Folge von Kontakt mit Autoantigenen) und dann als Memory/Effektor T_{reg} -Zellen $\alpha_E\beta_7$ exprimieren (Fisson et al. 2003, Huehn et al. 2004) (Abb. 3).

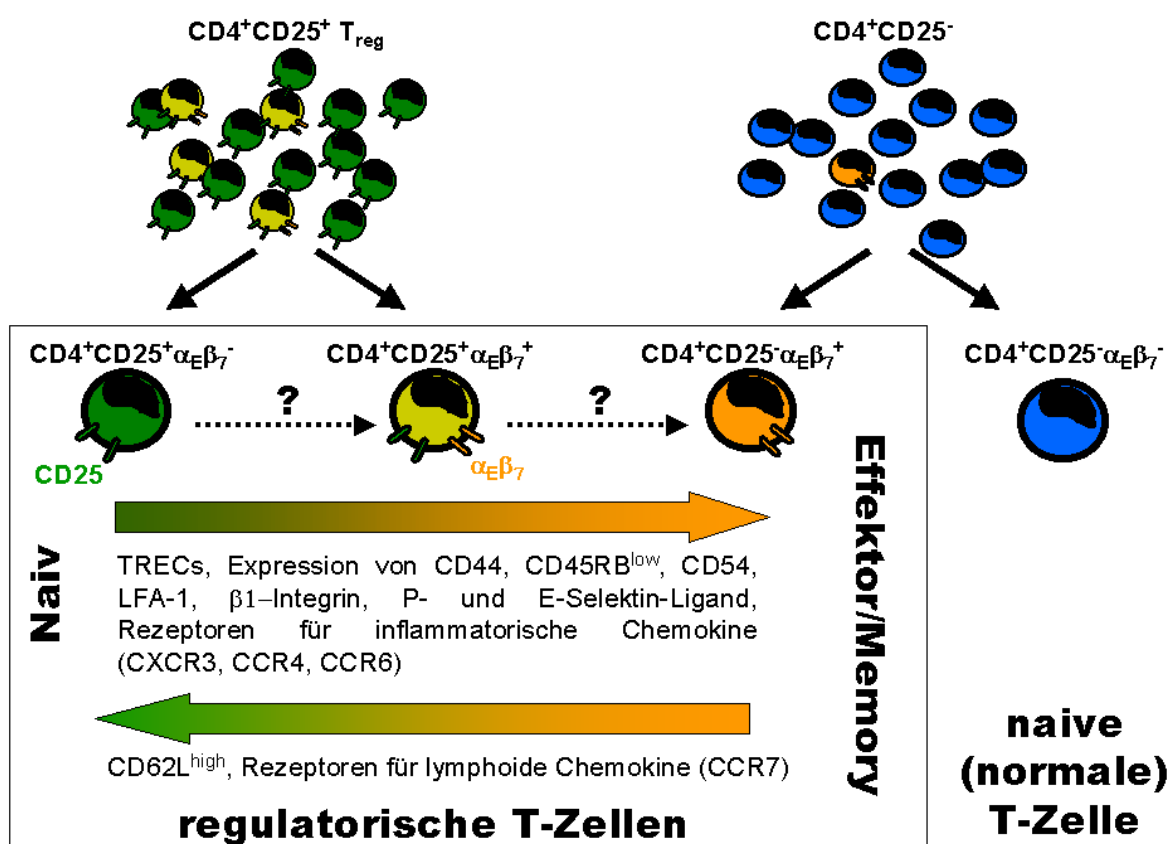


Abbildung 5: $\alpha_E\beta_7$ (CD103) unterteilt $CD4^+CD25^+ T_{reg}$ in verschiedene Subpopulationen und identifiziert $CD4^+CD25^+ T_{reg}$ -Zellen im peripheren Immunsystem von Mäusen.

Es ist möglich, dass sich auch die Effektorfunktionen der unterschiedlichen Subsets unterscheiden. Im Gegensatz zu $CD4^+CD25^+\alpha_E\beta_7^-$ T_{reg} -Zellen produzieren $CD4^+CD25^+\alpha_E\beta_7^+$ T_{reg} -Zellen deutlich mehr mRNA für IL-10 und TGF- β und sind auch in der Lage, die Produktion von IL-10 in $CD4^+CD25^-$ Zellen zu induzieren (Banz et al. 2003).

2.4 Zusammenfassung und Fragestellung

Trotz immenser Fortschritte im Wissen über regulatorische T-Zellen sind viele Dinge noch nicht ausreichend untersucht. In einer Reihe von klassischen spontanen oder experimentell induzierten Autoimmunerkrankungen und in Infektionsmodellen wurde gezeigt, dass die $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen essentiell für die Kontrolle solcher Erkrankungen sind. Weniger gut untersucht ist ihre Rolle in der Pathogenese der Arthritis, obwohl eine Arthritis als Teil des Autoimmunsyndroms, das nach dem Transfer von CD25-depletierten Milzzellen in athymische Mäuse entsteht, bereits in der initialen Publikation über $CD4^+CD25^+$ Zellen von Sakaguchis Gruppe beschrieben wurde (Sakaguchi et al. 1995). Im Modell der CIA sollen $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen einen protektiven Effekt haben, während eine solche protektive Rolle in der PGIA ausgeschlossen wurde (Luross et al. 2002, Bardos et al. 2003, Morgan et al. 2003).

Die vorliegende Arbeit soll diese Frage aufgreifen und die Rolle von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen im Modell der Antigen-induzierten Arthritis untersuchen. Folgende konkrete Fragestellungen sollen dabei berücksichtigt werden:

- Spielen $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen in der Pathogenese der AIA eine Rolle?
- Welche Pathogenesemechanismen der AIA beeinflussen T_{reg} -Zellen?
- Welche zellulären Interaktionen spielen hierbei eine Rolle?
- Eignen sich T_{reg} -Zellen für eine zelluläre Immuntherapie der Arthritis?

3 Materialien und Methoden

3.1 Geräte und Materialien

3.1.1 Geräte

AutoMACS[®]-Separationseinheit; *Miltenyi Biotech*, Bergisch Gladbach
Begasungsbrutschrank Cellstar; *Nunc*, Wiesbaden
Durchflusszytometer FacsCalibur[®]; *Becton Dickinson*, Heidelberg
Durchflusszytometer FacsDIVA[®]; *Becton Dickinson*, Heidelberg
Durchflusszytometer MoFlow[®]; *DakoCytomation*, Hamburg
ELISA-Reader EAR 400 FT; *SLT Laborinstruments*, Crailsheim
ELISPOT-Reader KS; *Carl Zeiss*, Oberkochen
Flüssigkeits-Szintillationszähler TopCount; *Perkin-Elmer*, Rodgau-Jügesheim
FPLC-Anlage; *Pharmacia*, Freiburg
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer; *Feinoptik*, Bad Blankenburg
Gamma-Counter; *Wallac*, Turku
Kolbenhubpipetten in verschiedenen Größen; *Eppendorf*, Hamburg
Kühlzentrifuge Jouan CR312; *Jouan*, Unterhaching
Laminar-Flow-Werkbank; *Elektromat*, Dresden
Mehrkanalpipetten; *Eppendorf*, Hamburg
MidiMACS[®]-Separationseinheit; *Miltenyi Biotech*, Bergisch Gladbach
MiniMACS[®]-Separationseinheit; *Miltenyi Biotech*, Bergisch Gladbach
MiniPerm-Bioreaktor; *Vivasciences*, Göttingen
Mikroskop Jenamed; *Carl Zeiss*, Jena
Multipipette; *Eppendorf*, Hamburg
Oditest-Schnelltaster; *Kröplin*, Schlüchtern
Pipettierhilfe; *Hirschmann Laborgeräte*, Eberstadt
Präparationsbesteck; *Aeskulap*, Tuttlingen
Spektrophotometer UV 1202, *Shimadzu*, Duisburg
Tischzentrifuge Biofuge 13; *Heraeus*, Hanau
Waschgerät Columbus; *SLT Laborinstruments*, Crailsheim
Zellharvester Unifilter-96; *Perkin-Elmer*, Rodgau-Jügesheim

3.1.2 Materialien

AutoMACS[®]-Separationssäulen; *Miltenyi Biotech*, Bergisch Gladbach

Einmalfilter (0,45 µm); *Schleicher & Schüll*, Dassel
 Einmalspitzen (10, 100 und 1000 µl); *Eppendorf*, Hamburg
 Einmalspritzen und -kanülen; *Braun-Melsungen*, Melsungen
 Einmalstangenpipetten in verschiedenen Größen; *Greiner*, Nürtingen
 Eppendorftubes; *Eppendorf*, Hamburg
 FACS®-Röhrchen; *Falcon*, Gräfelfing-Locham
 Gewebekulturflaschen in verschiedenen Größen; *Greiner*, Nürtingen
 Gewebekulturplatten 6-Well, 12-Well, 24-Well und 96-Well; *Greiner*, Nürtingen
 Gewebekulturschalen (60/15 mm); *Greiner*, Nürtingen
 Gewebekulturschalen (100/20 mm); *Corning Costar*, Bodenheim
 MidiMACS® LS⁺ Separationssäulen; *Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach
 Mikrotiterplatten für Zytokin-ELISA (Maxisorb); *Nunc*, Wiesbaden
 Mikrotiterplatten für Immunglobulin-ELISA; *Greiner*, Nürtingen
 Objektträger und Deckgläser; *Menzel*, Braunschweig
 Pre-Separation-Filter; *Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach
 Probenröhrchen für γ-Counter; *Perkin-Elmer*, Rodgau-Jügesheim
 Polystyrol- (PS-) Röhrchen (14 ml); *Greiner*, Nürtingen
 Polypropylen- (PP-) Röhrchen (50 ml); *Greiner*, Nürtingen
 PVDF-Membran 96-Well-Platte; *Millipore*, Eschborn
 TopSeal Abdeckfolie; *Perkin-Elmer*, Rodgau-Jügesheim
 Unifilter GF/C 96-Well-Platten; *Perkin-Elmer*, Rodgau-Jügesheim
 Zellsiebe; *Falcon*, Gräfelfing-Locham

3.1.3 Chemikalien

AlCl₃; *Sigma*, Deisenhofen
 Anti-APC-, anti-Biotin-, anti-FITC- und anti-PE-Microbeads®; *Miltenyi Biotec*,
 Bergisch Gladbach
 Anti-FITC-Multisort®-Kit; *Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach
 Anti-Rat-IgG; *Dako*, Hamburg
 BCIP/NBT-Lösung (Bromochloroindolylphosphat/Nitroblautetrazolium); *Sigma*,
 Deisenhofen
 Bordetella pertussis (hitzeinaktiviert); *Chiron Behring*, Marburg
 BSA (Bovines Serum Albumin); *Sigma*, Deisenhofen

CFSE ((5,6)-Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester)); *Molecular Probes*, Leiden

Concanavalin A (Con A); *Amersham*, Freiburg

EDTA; *Sigma*, Deisenhofen

Extravidin-Alkalische Phosphatase; *Sigma*, Deisenhofen

Fetales Kälberserum (FCS); *Gibco*, Karlsruhe

Glycin; *Sigma*, Deisenhofen

HCl; *Roth*, Karlsruhe

HCOOH; *Sigma*, Deisenhofen

Heparin (Liquemin N20000); *Roche*, Grenzach-Wyhlen

Hepes; *Gibco*, Karlsruhe

HiTrap-Protein-G; *Amersham*, Freiburg

H₂O₂; *Roth*, Karlsruhe

³H-Thymidin; *Amersham-Buchler*, Braunschweig

¹¹¹Indiumoxin; *Amersham-Buchler*, Braunschweig

KCl; *Roth*, Karlsruhe

KH₂PO₄; *Roth*, Karlsruhe

Komplettes Freundsches Adjuvans (CFA); *Sigma*, Deisenhofen

Kollagen Typ II; *Sigma*, Deisenhofen

2-Mercaptoethanol; *Gibco*, Karlsruhe

Methyliertes Rinderserumalbumin (mBSA); *Sigma*, Deisenhofen

MgCl₂; *Sigma*, Deisenhofen

Mycobacterium tuberculosis (Stamm H37RA); *Becton Dickinson*, Heidelberg

NaCl; *Sigma*, Deisenhofen

Na₂CO₃; *Roth*, Karlsruhe

NaHCO₃; *Merck*, Darmstadt

Na₂HPO₄; *Roth*, Karlsruhe

NaH₂PO₄; *Sigma*, Deisenhofen

NaN₃; *Sigma*, Deisenhofen

NaOH; *Sigma*, Deisenhofen

Na₂PO₄; *Sigma*, Deisenhofen

Natriumpyruvat; *Gibco*, Karlsruhe

NH₄Cl; *Sigma*, Deisenhofen

(NH₄)₂SO₄; *Sigma*, Deisenhofen

Nycodenz; *Nyegaard*, Oslo
o-Phenylendiamin; *Sigma*, Deisenhofen
p-Nitrophenylphosphat, *Serva*, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin/Glutamin; *Gibco*, Karlsruhe
Proleukin; *Chiron*, Ratingen
Propidiumjodid; *Sigma*, Deisenhofen
RPMI 1640 Medium; *Gibco*, Karlsruhe
Rekombinantes humanes IL-2; *Chiron*, Ratingen
Szintillationscocktail Microscint O; *Perkin Elmer*, Rodgau-Jügesheim
Streptavidin-APC; *BD Pharmingen*, Heidelberg
Streptavidin-Peroxidase; *Dianova*, Hamburg
Streptavidin-PE; *BD Pharmingen*, Heidelberg
TRIS; *Sigma*, Deisenhofen
Trypanblau; *Sigma*, Deisenhofen
Tween 20; *Sigma*, Deisenhofen
Zitronensäure; *Sigma*, Deisenhofen

3.1.4 Verwendete Kulturmedien, Lösungen und Puffer

3.1.4.1 Lösungen für Zellkultur, -sortierung und -analyse

Komplettes Medium

RPMI 1640 supplementiert mit:

- 10% (v/v) FCS
- 2 mM Glutamin
- 10 mM Hepes
- 100 U/ml Penicillin
- 0,1 mg/ml Streptomycin
- 0,05 mM 2-Mercaptoethanol
- 1 mM Natriumpyruvat

PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)

- 8 g NaCl
- 1,44 g Na₂PO₄ x 2 H₂O
- 0,2 g KH₂PO₄
- 0,2 g KCl

in 1 l Aqua bidest. lösen und auf pH 7,4 einstellen

Ammoniumchlorid/TRIS zur Erythrozyten-Lyse

1. 0,83% (w/v) NH_4Cl (7,47g in 900ml H_2O)
 2. TRIS (2,059g in 100ml H_2O) auf pH 7,65
- 9 Teile von 1. + 1 Teil von 2. mischen, auf pH 7,2 einstellen

FACS[®]-Puffer

PBS supplementiert mit:

BSA 0,5% (w/v)

NaN_3 0,1% (w/v)

MACS[®]-Running-Puffer

PBS supplementiert mit:

0,5% BSA (w/v)

EDTA 2 mM

MACS[®]-Rinsing-Puffer

PBS supplementiert mit:

EDTA 2 mM

3.1.4.2 Lösungen zur Antikörperpräparation

Ammoniumsulfat zur Antikörperfällung

gesättigte (3.9 M) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (in Aqua bidest.) herstellen

1M TRIS-HCL-Lösung

zu 100 ml 1M TRIS (in Aqua bidest.) 50 ml 1N HCl zugeben und auf pH 8 einstellen.

Startpuffer (Phosphatpuffer 0,1M)

8,6 g Na_2HPO_4

5,6 g NaH_2PO_4

in 1 l Aqua bidest. lösen und auf pH 7,0 einstellen

Elutionspuffer (Glycin-HCl-Puffer 0,1M)

7 g Glycin in 900 ml Aqua bidest. lösen

mit 1M HCl auf pH 2,7 einstellen und auf 1000 ml auffüllen

3.1.4.3 Puffer für ELISA/ELISPOT

Beladungspuffer für ELISA

A) Bikarbonatpuffer

0,84 g NaHCO_3 in 100 ml Aqua bidest. lösen

B) Natriumphosphatpuffer

1,48 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ und 1,85 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml Aqua bidest. lösen

C) Natriumphosphatpuffer

1,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml Aqua bidest. lösen

Waschpuffer für ELISA/ELISPOT

0,05% (v/v) Tween 20 gelöst in PBS

Substratpuffer für Peroxidase

2,1 g Zitronensäure

16,2 ml 1 N NaOH

in 84 ml Aqua bidest. lösen

Substratlösung für Peroxidase

2 mg/ml *o*-Phenylendiamin (*o*PD) gelöst in Zitratpuffer

vor dem Auftragen Zugabe von 25 $\mu\text{l/ml}$ H_2O_2 (3%)

Substratpuffer für Alkalische Phosphatase

100 ml 0,1M TRIS

20 mg MgCl_2

Substratlösung für Alkalische Phosphatase

2,6 mg/ml *p*-Nitrophenylphosphat (*p*NPP) in Substratpuffer

Stopplösung für die Alkalische Phosphatase

5,3 g Na_2CO_3 auf 100 ml Aqua bidest.

3.1.4.4 Lösungen für Histologie

Entkalkungslösung

25%ige HCL

100%ige HCOOH

70 g AlCl₃

auf 1 l Aqua bidest.

3.1.5 Verwendete Antikörper

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Antikörper (Labor: im eigenen Labor hergestellte und konjugierte Antikörper)

gerichtet gegen	Klon	Markierung	verwendet für	Herkunft
CD3	145 2C11	keine	Stimulation	Labor
CD4	GK1.5	FITC	FACS®/Zellsortierung	Labor
	H129.9	PE-Cy5	FACS®	BD Pharmingen
CD8	TIB 105	keine	Zellsortierung	Labor
CD11b/CD16 (Mac-1)	M1/70	keine	Zellsortierung	Labor
CD25	PC61	keine	Depletion <i>in vivo</i>	Labor
	PC61	FITC	Zellsortierung	BD Pharmingen
	PC61	APC	Zellsortierung	BD Pharmingen
	7D4	Biotin	Zellsortierung	BD Pharmingen
CD28	37.51	keine	Stimulation	Labor
CD45R/B220	RA3-6B2	Biotin	FACS®	BD Pharmingen
CD103/αEβ₇	M290	Biotin	Zellsortierung	Labor
IFN-γ	JES6-1A12	keine	ELISA/ELISPOT	BD Pharmingen
	JES6-5H4	Biotin	ELISA/ELISPOT	BD Pharmingen
IL-2	R4-6A2	keine	ELISA/ELISPOT	BD Pharmingen
	XMG1.2	Biotin	ELISA/ELISPOT	BD Pharmingen
IL-4	BVD4-1D11	keine	ELISA/ELISPOT	BD Pharmingen
	BVD6-24G2	Biotin	ELISA/ELISPOT	BD Pharmingen
IL-5	TRFK-5	keine	ELISA/ELISPOT	BD Pharmingen
	TRFK-4	Biotin	ELISA/ELISPOT	BD Pharmingen
IL-10	JES5-2A5	keine	ELISA/ELISPOT	BD Pharmingen
	SXC-1	Biotin	ELISA/ELISPOT	BD Pharmingen
IL-1β	MAB401	keine	ELISA	R&D Systems
	BAF401	Biotin	ELISA	R&D Systems
IL-6	MP5-20F3	keine	ELISA	BD Pharmingen
	MP5-32C11	Biotin	ELISA	BD Pharmingen
TNF-α	G281-2626	keine	ELISA	BD Pharmingen
	MP6-XT3	Biotin	ELISA	BD Pharmingen
IgG1	polyklonal	keine/AP	ELISA	Southern Biotechnology
IgG2a	polyklonal	keine/AP	ELISA	Southern Biotechnology
IgG2b	polyklonal	keine/AP	ELISA	Southern Biotechnology

3.2 Versuchstiere und Arthritisinduktion

3.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für alle Tierexperimente wurden weibliche C57Bl/6-Mäuse im Alter von 6-10 Wochen verwendet. Die Tiere stammten vom Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena oder von Charles River Laboratories, Sulzfeld. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden; Fütterung mit Altromin-Pellets # 1326, Wasser *ad libitum*).

Alle Manipulationen der Versuchstiere wurden nur durch dafür qualifizierte Personen durchgeführt. Alle Tierversuche waren vom Thüringer Landesverwaltungsamt genehmigt (AZ 02-17/00 vom 18.05.2000).

3.2.2 Immunisierung und Arthritisinduktion

Für die Immunisierung wird zunächst eine mBSA-Lösung (2 mg/ml) in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Diese Lösung wird in einem gleichen Volumen komplettem Freund'schem Adjuvans, das auf eine auf eine Endkonzentration von 2 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA) supplementiert wurde, suspendiert.

Von diesem Ansatz werden 21 Tage vor Arthritisinduktion (d -21) 100 µl (entspricht 100 µg mBSA) subkutan in die rechte Flanke jeder Maus gespritzt. Zusätzlich erhalten die Tiere eine intraperitoneale Injektion von 5×10^8 hitzeinaktivierten *Bordetella pertussis*-Keimen. Zur Boosterung wird diese Behandlung eine Woche (d-14) später wiederholt, das Antigen-Adjuvansgemisch wird aber nun subkutan im Bereich der Schwanzwurzel injiziert.

Zwei Wochen nach der Booster-Immunisierung (d 0) erfolgt die Auslösung der Arthritis durch die intraartikuläre Injektion von 25 µl (entspricht 100 µg mBSA) einer sterilen mBSA-Lösung (4 mg/ml in PBS) in das rechte Kniegelenk. Das linke Kniegelenk bleibt unbehandelt.

3.2.3 Beurteilung der Schwere der Arthritis

3.2.3.1 Gelenkschwellung

Die Arthritisinduktion im rechten Kniegelenk führt zu einer, besonders in der akuten Phase der AIA, deutlichen Gelenkschwellung. Diese wird mittels eines Oditest-

Schnelltasters gemessen und die Differenz aus rechtem und linken Kniegelenk dient als Maß für die klinische Schwere der Arthritis.

3.2.3.2 Histologie

Unter leichter Ethernarkose werden die Versuchstiere am Ende des Experimentes entblutet und durch zervikale Dislokation getötet. Die Kniegelenke werden entnommen und für mindestens 24 Stunden in 4,5%igen gepuffertem Formalin bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend werden die Gelenke in Entkalkungslösung entkalkt. Über eine aufsteigende Alkoholreihe werden die Gelenke entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Von diesen Präparaten werden mindestens 3 frontale Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger überführt. Diese Schnitte werden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und anschließend mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Die so angefertigten Präparate werden von mindestens zwei unabhängigen Begutachtern ohne Kenntnis der Versuchsgruppen auf den Schweregrad der histologischen Veränderungen untersucht. Zur Bewertung dient das in Tabelle 3 dargestellte Auswerteschema. Die Summe der Punkte für Mesothelveränderungen und Infiltration ergibt ein Maß für die Stärke der Entzündung. Die Summe aus Knorpelnekrosen und Pannusformation ergibt ein Maß für die Stärke der Gelenkdestruktion. Die Summe aus Entzündung und Gelenkdestruktion ergibt wiederum den Gesamt-Arthritisscore.

Tabelle 3: Semiquantitatives Scoresystem zur Bewertung der histologischen Schwere der AIA

Punkte	Mesothelveränderungen
0,5	Geringe Abnormitäten, Schwellung, kubische Transformationen einschichtig, herdförmig
1	Herdförmige kubische Transformationen, einschichtig, an mehreren Stellen
1,5	Wie 1, jedoch große Teile der Tunica synovialis oder sämtliche Areale umfassend
2	Kubische Transformationen, mehrreihig, herdförmig
2,5	Wie 2, jedoch große Teile der Tunica synovialis oder sämtliche Areale umfassend, Nekrosen möglich
3	Mehrreihiges Mesothel mit ausgedehnten Nekrosen
Punkte	Infiltration
0,5	Einzelne schütterere, herdförmige Infiltrate von Lymphozyten/Plasmazellen auf die Recessus beschränkt

1	Herdförmige Infiltrate an mehreren Stellen, aber beschränkt
1,5	Diffuse Infiltrate, beschränkt
2	Herdförmige Infiltrate, ausgedehnt im gesamten Gelenk
2,5	Diffuse Infiltrate, ausgedehnt im gesamten Gelenk
3	Ausgeprägte Infiltrate, auf die Kapsel übergreifend oder mit herdförmiger Aggregation
Punkte	Knorpelschädigung
0,5	Oberflächliche Nekrose in einer Gelenkregion, dieselbe nicht vollständig umfassend
1	Oberflächliche herdförmige Nekrose in mehr als einer Gelenkregion
1,5	Nekrosen in mehr als einer Region oder eine Region vollständig umfassend
2	Nekrosen bis zur Tidemark reichend, herdförmig ausgeprägt
2,5	Nekrosen bis zur Tidemark reichend, in mehr als einer Gelenkregion
3	Ausgedehnte tiefgreifende Nekrosen mindestens bis zur Tidemark an mehreren Stellen
Punkte	Pannusbildung
0,5	Angedeutete Entwicklung an ein bis zwei Stellen mit geringer Infiltration
1	Entwicklung an ein bis zwei Stellen mit deutlicher Infiltration
1,5	Entwicklung an mehreren Stellen mit deutlicher Infiltration und zungenförmiger Auflagerung auf der Knorpeloberfläche oder zangenförmiger Infiltration an einer Stelle
2	Entwicklung an mehreren Stellen mit zangenförmiger Infiltration oder flaches Überwachsen einer Gelenkfläche
2,5	Deutlich ausgeprägte Entwicklung an mehreren Stellen mit zangenförmiger Infiltration oder zungenförmigem Überwachsen einer oder mehrerer Gelenkflächen
3	Ausbildung an mehr als vier Stellen oder exzessive Ausbildung an zwei Stellen

3.3 Behandlung mit anti-CD25-Antikörper

3.3.1 Herstellung und Aufreinigung des Antikörpers

Das Hybridom PC61 5.3 (ATCC-Nummer TIB-222) wurde in kompletten RPMI-1640-Medium kultiviert. Zunächst wurden die aufgetauten Zellen in Kulturflaschen expandiert. Nach Erreichen einer ausreichend hohen Zellmenge wurden 35 ml Zellsuspension (2×10^6 Zellen/ml) in das Produktionsmodul des MiniPerm®-Bioreaktors überführt. Dieser Bioreaktor besteht aus einem Produktionsmodul, in dem die Zellen kultiviert werden, und einem Versorgungsmodul, in dem sich ein Mediumvorrat befindet. Beide Module sind durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt, die den Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselendprodukten zulässt. Dadurch können im Produktionsmodul die Zellen

ohne ständigen Mediumwechsel in einer hohen Dichte kultiviert werden, wodurch hohe Antikörperkonzentrationen im Überstand erreicht werden. Das Versorgungsmodul wurde mit kompletten RPMI-MEDIUM gefüllt (der FCS-Anteil wurde später schrittweise auf 5% reduziert) und die Zellen bei 4 Umdrehungen/min bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Das Medium im Versorgungsmodul wurde anfänglich alle 4, später alle 2 Tage zur Hälfte gewechselt. Die Zellen aus dem Produktionsmodul wurden alle 4-6 Tage abzentrifugiert und der Überstand gesammelt.

3.3.2 Aufreinigung

3.3.2.1 Fällung

Der Überstand aus der Standkultur wurde zunächst aufkonzentriert, während die Überstände aus dem MiniPerm[®] direkt weiterverwendet wurden. Die Überstände wurden mit 10% 1 M TRIS-HCl-Lösung gepuffert. Die Proteine wurden durch tropfenweises Zugabe der gleichen Menge einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung ausgefällt und abzentrifugiert. Die gefällten Proteine wurden anschließend in PBS gelöst und noch zweimal gefällt. Nach der letzten Fällung wurden die so gewonnenen Proteine über Nacht gegen PBS dialysiert.

3.3.2.2 Protein-G-Chromatographie

Die Proteinlösung wurde, nachdem sie filtriert worden war, mittels einer FPLC-Anlage auf eine HiTrap-Protein-G-Säule aufgetragen. Als Puffer diente hierbei 0,1 M Natriumphosphatpuffer (Startpuffer). Der Durchlauf (Serumproteine) wurde verworfen und das gebundene IgG mittels Elutionspuffer von der Säule eluiert. Der so gereinigte Antikörper wurde erneut gegen PBS dialysiert, aufkonzentriert und sterilfiltriert. Die Reinheit dieser Präparation wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch die Messung der Extinktion E einer verdünnten Lösung des mAk im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Konzentration C wurde anhand der Formel (1) berechnet.

$$(1) \quad C = 1,38 \cdot E \cdot V$$

E	Extinktion bei 280 nm
V	Verdünnungsfaktor
C	mg IgG/ml

3.3.3 Behandlungsschema

Den immunisierten Mäusen wurden vier und zwei Tage vor der Arthritisinduktion je 0,5 mg des Antikörpers intraperitoneal injiziert. Zur Kontrolle diente polyklonales Ratten IgG, das durch Fällung und Protein-G-Chromatographie aus dem Serum normaler Ratten gewonnen wurde.

3.4 Zelltransfer

3.4.1 Zellisolation

3.4.1.1 Isolation von $CD4^+CD25^+$ Zellen

Spezifische Zellpopulationen können mit Hilfe von magnetic-activated cell sorting (MACS[®]) relativ unkompliziert und schnell aufgereinigt werden. Dazu werden Magnetpartikel, die mit Antikörpern konjugiert sind, verwendet. Mit diesen sehr kleinen Magnetpartikeln (ca. 50 nm; Microbeads[®]) werden die gewünschten Zellen markiert und können dann in einer Trennsäule aufgetrennt werden. Die Trennsäule enthält eine Matrix, in der im Magnetfeld eines Hochleistungsmagneten ein Hochgradientenfeld entsteht, das ausreicht, die Microbead-markierten Zellen in der Säule zurückzuhalten. Die nicht magnetisch markierten Zellen (Negativfraktion) laufen ungehindert durch die Säule. Die magnetisch markierten Zellen werden danach durch Elution der Säule außerhalb des Magnetfeldes gewonnen.

$CD4^+CD25^+$ Zellen wurden durch eine Zweischnitt-Zellsortierung gewonnen. Gepoolte Milzen und Lymphknoten (inguinal, popliteal, axillär, zervikal, mesenterial, paraaortal) wurden unter sterilen Bedingungen aus naiven oder immunisierten Mäusen entfernt und in RPMI-Medium überführt. Die mit einer Schere zerkleinerten Organe wurden mit einem Spritzenstempel durch ein Metallsieb gepresst. Aus der so gewonnenen Einzelzellsuspension wurden die Erythrozyten durch Lyse mit Ammoniumchlorid/TRIS-Lösung entfernt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit MACS[®]-Running-Puffer gewaschen und pro Tier in 2 ml MACS[®]-Running-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden dann mit anti-CD4-FITC (Klon GK1.5, eigene Herstellung, 1:1.000) und anti-CD25-Biotin (Klon 7D4, 1:1.000) für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen gezählt und auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/60 μ l Puffer eingestellt. Pro 10^7 Zellen wurden dann 6 μ l anti-FITC-Multisort-Microbeads[®] dazugeben. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 6-12°C wurde die Zellsuspension gewaschen und der magnetischen

Separation zugeführt. Die Zellen wurden entweder mit der MidiMACS®-Separationseinheit und LS⁺ Säulen, oder mit dem AutoMACS® in FITC-positive und FITC-negative Zellen sortiert.

Das enzymatische Ablösen der Microbeads vom Anti-FITC-Antikörper erfolgte durch Zugabe von 20 µl Release Reagent pro ml eluierter FITC-positiver Zellsuspension und nachfolgende Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten.

Nach erneutem Waschen wurden eventuell noch magnetisch gelabelte Zellen sowie die abgetrennten Microbeads durch erneute Auftrennung über eine Säule entfernt. Die verbleibenden Zellen wurden gezählt, auf 1×10^7 Zellen in 90 µl Puffer eingestellt und für 15 Minuten bei 6-12°C mit anti-Biotin-Microbeads® (1:10 verdünnt) inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese in CD25⁻ und CD25⁺ Zellen separiert. Die Reinheit diese Zellen wurde durchflusszytometrisch kontrolliert und betrug regelmäßig für CD4⁺ >90%, für CD4⁺CD25⁻ ~95% und für CD4⁺CD25⁺ ~85%.

3.4.1.2 Isolation von $\alpha_E\beta_7$ - und CD25-exprimierenden T_{reg} -Subsets

Diese aufwendigen Sortierungen wurden bei der AG Experimentelle Rheumatologie/Charité Berlin in der Core Unit Flow Cytometry and Cell Sorting am Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin durchgeführt.

Erythrozytendepletierte Einzelzellsuspensionen aus Milzen und Lymphknoten (s.o.) wurden mit anti-CD25-FITC (Klon PC61, Becton Dickinson) und anti- $\alpha_E\beta_7$ -Biotin und Streptavidin-PE gefärbt. Alle-FITC- und PE-gefärbten Zellen wurden mit anti-FITC- und anti-PE-Microbeads® und AutoMACS® isoliert. Nach dieser Vorisolation wurden die Zellen anschließend CD4-markiert und durchflusszytometrisch in die verschiedenen Subpopulationen aufsortiert: CD4⁺CD25⁺ $\alpha_E\beta_7$ ⁻, CD4⁺CD25⁺ $\alpha_E\beta_7$ ⁺, CD4⁺CD25⁻ $\alpha_E\beta_7$ ⁺. CD4⁺CD25⁻ $\alpha_E\beta_7$ ⁻ Zellen wurden aus der Negativfraktion des MACS®-Sortes mittels CD4-Microbeads® isoliert (Abbildung 6).

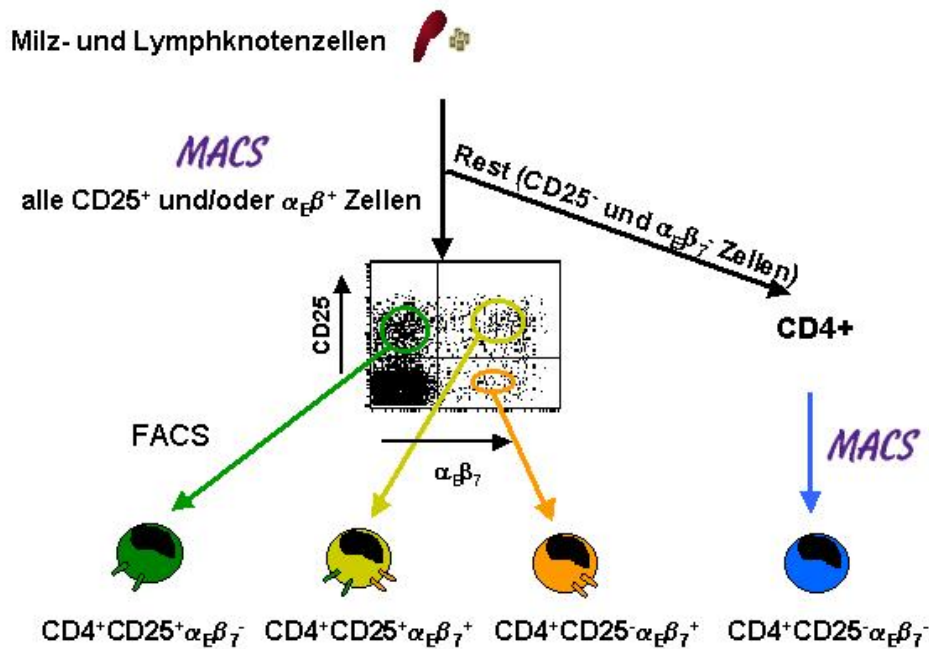


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Sortierung der unterschiedlichen T_{reg}-Subsets

3.4.2 Präaktivierung und Transfer

Die gewonnenen Zellen wurden gewaschen und entweder in PBS überführt und direkt in die Rezipienten transferiert (intravenöse Injektion über laterale Schwanzvene) oder für 24 beziehungsweise 72 Stunden mit immobilisiertem anti-CD3 (Klon 145 2C11; 3 µg/ml, eigene Herstellung), anti-CD28 (Klon 37.51; 10 µg/ml, eigene Herstellung) in Gegenwart von 100 U/ml rekombinantem humanen IL-2 (Proleukin, Chiron) stimuliert. Diese Zellen wurden anschließend gewaschen, in PBS aufgenommen und ebenfalls i.v. transferiert.

3.5 Messung der zellulären Immunreaktivität

3.5.1 Verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion

Zur Abschätzung der Stärke der verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion (delayed type hypersensitivity; DTH) wurde den Tieren 7 Tage (d7) nach der Arthritisinduktion 5 µg mBSA in 10 µl PBS intrakutan in ein Ohr injiziert. Die Dicke des Ohres wurde vor der Antigenapplikation sowie 24 und 48 Stunden danach gemessen. Der Anstieg der Ohrdicke dient als Maß für die Stärke der DTH.

3.5.2 Untersuchung der zellulären Immunreaktivität *in vivo*

3.5.2.1 Proliferationsassay, Überstandsgewinnung zur Messung der Zytokinproduktion

Lymphknoten (inguinal, popliteal der rechten Seite sowie teilweise die axillären und die Lymphknoten der Gegenseite) sowie Milzen wurden steril entnommen und mit Pinzetten zu einer Einzelzellsuspension zerzupft. Nach dem Lysieren der Erythrozyten mit Ammoniumchlorid/TRIS-Lösung wurden die Zellen zweimal gewaschen, gezählt und auf 1×10^6 Zellen/ml komplettes RPMI-Medium eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 200 μ l/Well in 96-Well-Platten für den Proliferationsassay als Triplikate und 1 ml/Well in 24-Well-Platten zur Überstandsgewinnung gegeben, mit Antigen (mBSA 25 μ g/ml; PPD, Kollagen Typ II und Proteoglykane 50 μ g/ml) oder polykonal (ConA 5 μ g/ml, anti-CD3 1 μ g/ml) stimuliert und für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Für den Proliferationsassay wurde für die letzten 16-18 Stunden der Kultur radioaktiv markiertes Thymidin (3 H-Thymidin; 0,5 μ Ci/Well) zugegeben. Die DNA der sich teilenden Zellen, die durch den Einbau des 3 H-Thymidin radioaktiv markiert wurde, wurde anschließend mit dem Zellharvester Unifilter-96 auf Unifilter-96-Well GF/C-Platten geerntet. Diese Platten wurden anschließend getrocknet, der Boden mit Folie versiegelt, pro Well 30 μ l des Szintillationscocktail Microscint O eingefüllt und mit einer Abdeckfolie TopSeal versehen. Die Radioaktivität wurde mit dem Szintillationszähler TopCount bestimmt.

Zur Überstandsgewinnung wurden die Zellen nach 72 Stunden abzentrifugiert und der Überstand aliquotiert und bis zur Messung bei -70°C aufbewahrt.

3.5.2.2 ELISPOT-Assay

Grundlagen

Zur Messung der antigenspezifischen Zytokinproduktion auf Einzelzellniveau wurden ELISPOT-Assays durchgeführt. Bei diesem Test werden Mikrotiterplatten mit mAK gegen die interessierenden Zytokine beladen. Anschließend werden die zu testenden Zellen in die Wells gegeben. Dort, wo eine Zelle das betreffende Zytokin sezerniert, wird es von dem mAk gebunden. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit werden die Zellen dann abgespült und die Zytokin-Antikörper-Komplexe mit entsprechenden enzymkonjugierten Sekundärantikörpern und einer Farbreaktion sichtbar gemacht.

Es entstehen Punkte („Spots“), die mittels einer Mikroskopkamera und entsprechender Software ausgezählt werden können (Abb. 7). Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Anzahl der antigenspezifischen Zellen schnell und in vielen Proben gleichzeitig gemessen werden kann. Nachteilig ist, dass sich die Zytokinproduktion nicht bestimmten Zelltypen ($CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zelle oder B-Zellen) zuordnen lässt.

Durchführung

PVDF-Membran-96-Well-Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 4°C mit den in Tabelle 4 aufgeführten Primärantikörpern (verdünnt mit sterilem PBS, 100 µl/Well) beschichtet. Nach dem Waschen der Platten mit sterilem PBS wurde die freie Proteinbindungskapazität durch Inkubation mit 300 µl/Well komplettem RPMI-Medium für 2 Stunden blockiert. Anschließend wurden die Milz- oder Lymphknoten-zellen (2×10^5 /Well für IFN- γ und IL-2 bzw. 1×10^6 /Well für IL-4, IL-5 und IL-10) als Duplikate in komplettem RPMI-Medium (200 µl/Well) ausgesät und stimuliert. Nach 24 (IL-2, IFN- γ) bzw. 48 Stunden (IL-4, IL-5, IL-10) wurden die Platten dreimal mit PBS und dreimal mit Aqua bidest. gewaschen. Danach wurden sie mit den entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörpern (verdünnt in PBS/1%BSA (w/v), 100 µl/Well) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen in PBS/Tween wurden pro Well 100 µl Extravidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat aufgetragen (1:30.000 in PBS/1%BSA (w/v)) und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die Spots durch Inkubation mit BCIP/NBT entwickelt. Nachdem deutliche Spots sichtbar waren, wurde die Reaktion durch Waschen der Platten mit Aqua dest. abgebrochen. Die Platten wurden getrocknet und die entstandenen Spots mit dem KS-ELISPOT-Reader ausgezählt.

Tabelle 4: Übersicht über die für die ELISPOTs verwendeten Antikörperklone und deren eingesetzter Endkonzentration

Zytokin	Primärantikörper	Endkonzentration	Sekundärantikörper	Endkonzentration
IFN- γ	JES6-1A12	2 µg/ml	JES6-5H4	2 µg/ml
IL-2	R4-6A2	3 µg/ml	XMG1.2	2 µg/ml
IL-4	BVD4-1D11	2 µg/ml	BVD6-24G2	2 µg/ml
IL-5	TRFK-5	5 µg/ml	TRFK-4	2 µg/ml
IL-10	JES5-2A5	5 µg/ml	SXC-1	2 µg/ml

Stimulation

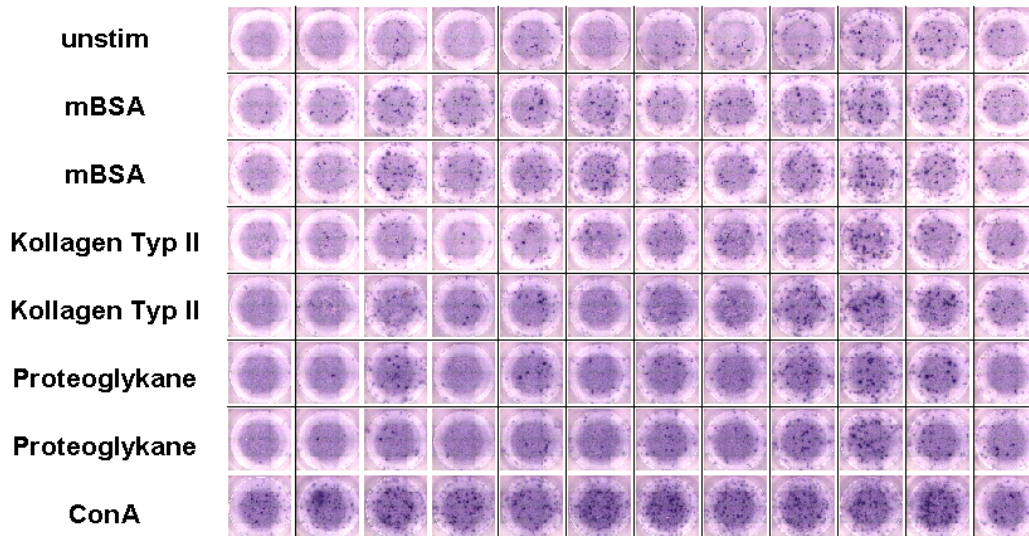


Abbildung 7: Repräsentatives Beispiel einer ELISPOT-96-Well-Mikrotiterplatte nach Entwicklung der Spots und Aufnahme mit dem KS-ELISPOT-Reader. Die entstandenen Punkte werden von der Software automatisch ausgezählt. Dargestellt ist die IL-5-Produktion von Milzzellen.

3.6 Messung der humoralen Immunreaktivität

3.6.1 mBSA- und knorpelmatrixspezifische Antikörper

IgG-Antikörper gegen mBSA und die knorpelmatrixspezifischen Autoantigen Kollagen Typ I, Kollagen Typ II und Proteoglykane wurden mittels ELISA gemessen.

Hierfür wurden 96-Well-ELISA-Mikrotiter-Platten mit 0,125 µg/ml mBSA bzw. 10 µg/ml Kollagen Typ I, Typ II und Proteoglykan (eigene Herstellung aus Rattenschwanzsehne beziehungsweise Rinderknorpel) in Bikarbonatpuffer (100 µl/Well) über Nacht bei 4 °C beladen. Nach dem Waschen der Platten wurde die freie Proteinbindungskapazität durch Inkubation mit 300 µl/Well PBS/2% BSA (w/v) für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Die zu messenden Seren wurden in Verdünnungsstufen (Start bei 1:50, dann 3 Stufen 1:10 verdünnt mit PBS/1% (w/v) BSA; 100 µl/Well) über Nacht bei 4 °C auf den Platten inkubiert. Nach dem Waschen der Platten wurde das gebundene antigenspezifische IgG mit Peroxidase-markiertem anti-Maus-IgG detektiert (1:2.000 in PBS/1% (w/v) BSA; 100 µl/Well). Die Entwicklung des ELISA erfolgte mit dem Substrat *ortho*-Phenylendiamin in Zitratpuffer (100 µl/Well). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2n H₂SO₄ abgestoppt und die Platte im ELISA-Reader gemessen (492 nm/620 nm). Da für diese antigenspezifischen IgG keine Standards zur Verfügung stehen, wurde als

Kontrolle für die Linearität des Assay eine Verdünnungsreihe aus gepooltem Serum immunisierter Mäuse mitgeführt.

3.6.2 Immunglobulin-Subklassen

Auch die Bestimmung der IgG-Subklassen erfolgt mit der ELISA-Technik. Für die Bestimmung der mBSA-spezifischen IgG-Subklassen wurden 96-Well-ELISA-Mikrotiter-Platten mit 0,125 µg/ml mBSA (s.o.) beladen. Für die Bestimmung der Gesamt-IgG-Subklassen wurden die Platten mit Ziege-anti-Maus-IgG1, -IgG2a und -IgG2b (1:1000 in PBS/1% (w/v) BSA) beladen (100 µl/Well über Nacht, 4°C). Anschließend wurden die Platten gewaschen und die freie Proteinbindungskapazität durch Inkubation mit 300 µl/Well PBS/2% (w/v) BSA für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurden die verdünnten Seren (100 µl/Well) aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platten wurden die gebundenen IgG-Subklassen mit Ziege-anti-Maus-IgG1, -IgG2a oder -IgG2b-Alkalische-Phosphatase-Konjugat detektiert (1:2.000 für mBSA-spezifische bzw. 1:1.000 für Gesamt-IgG-Subklassen in PBS/1% BSA (w/v), 1 Stunde bei Raumtemperatur). Die Platten wurden mit dem Substrat für die Alkalische Phosphatase (*para*-Nitrophenylphosphat in Substratpuffer) entwickelt. Die Reaktion wurde mit 100 µl/Well Stopplösung abgestoppt und die Extinktion der Platten bei 405 nm/690 nm im ELISA-Reader gemessen.

Als Standard für die Gesamt-IgG-Subklassen dienten serielle Verdünnungsreihen von aufgereinigten Maus-IgG1, -IgG2a und -IgG2b. Da für die mBSA-spezifischen IgG-Subklassen keine Standards zur Verfügung stehen, wurde als Kontrolle für die Linearität des Assay eine Verdünnungsreihe aus gepooltem Serum immunisierter Mäuse mitgeführt.

3.7 Untersuchungen zum Migrationsverhalten von CD4⁺CD25⁺ Zellen

Für Untersuchungen zum Homingverhalten der T_{reg}-Zellen *in vivo* wurde ein abgewandeltes Sortier-Protokoll verwendet, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch an die Zellen gebundene Magnetbeads oder Antikörper zu vermeiden. Eine erythrozytendepletierte Einzelzellsuspension aus Milzen und Lymphknoten wurde zunächst auf mit anti-Ratten-IgG-beschichteten (kreuzreaktiv mit Maus-IgG) Petrischalen für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die nicht adhärenen Zellen wurden vorsichtig abgespült und für 15 Minuten auf Eis mit anti-CD8 (Klon

TIB-105) und anti-Mac-1 (Klon M1/70) inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut auf anti-Ratten-IgG-beschichteten Petrischalen für 20 Minuten inkubiert. Die nicht adhärenen Zellen (>90% CD4⁺) wurden anschließend mit anti-CD4-F(ab)-FITC, anti- $\alpha_E\beta_7$ -F(ab)₂-Biotin und Streptavidin-PE bzw. anti-CD25-APC gefärbt und durchflusszytometrisch in CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ bzw. $\alpha_E\beta_7$ -exprimierende T_{reg}-Zellen sortiert. Die Reinheit der CD4⁺CD25⁻ bzw. CD4⁺CD25⁺ Zellpopulationen war bei der Reanalyse >95% und für die $\alpha_E\beta_7$ -exprimierenden T_{reg}-Zellen zwischen 85 und 98%.

Die so separierten Zellen wurden mit ¹¹¹Indiumoxin (2x10⁸ Zellen/ml; 10 µCi/ml) für 20 min bei Raumtemperatur markiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation von einer Stunde bei 37°C und die toten Zellen wurden durch Zentrifugation über einen Nycodenz-Gradienten entfernt. Die Zellen wurden gewaschen und 1x10⁶ Zellen wurden i.v. transferiert.

Nach 24 Stunden wurden die Tiere unter Ethernarkose entblutet, getötet und die Organe (Lymphknoten, Kniegelenke, Leber, Lunge, Milz) entnommen. Die in den Organen sowie im Restkörper enthaltene Radioaktivität wurde im γ -Counter gemessen und der prozentuale Anteil der in den Organen verteilten Radioaktivität an der Gesamtradioaktivität der Maus berechnet.

Alternativ wurden die sortierten Zellen mit 2,5 µM CFSE in PBS für 2 Minuten und 40 Sekunden inkubiert, gewaschen und ebenfalls i.v. transferiert. Die Rezipienten wurden nach 24 Stunden entblutet, getötet und es wurden Einzelzellsuspensionen aus Lymphknoten und Milzen hergestellt. Diese wurden mit anti-CD4-PE-Cy5 gefärbt. Anschließend wurde der Anteil der CFSE-positiven an den CD4-positiven Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Tote Zellen wurden durch Zugabe von Propidiumjodid von der Analyse ausgeschlossen

3.8 Zytokin-ELISA

Die Zytokine in den Zellkulturüberständen wurden mit ELISA bestimmt. Hierzu wurden 96-Well-Platten (Nunc Maxisorb) mit den in Tabelle 5 angegebenen Primärantikörpern im entsprechenden Beladungspuffer über Nacht bei 4°C beladen (100 µl/Well). Anschließend werden die Platten gewaschen und die freie Proteinbindungskapazität durch Inkubation mit 300 µl/Well PBS/2% (w/v) BSA für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurden die (verdünnten)

Proben (100 µl/Well) aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Detektion erfolgte mit den in Tabelle 5 genannten biotinylierten Sekundärantikörpern (100 µl/Well) für 2 Stunden bei Raumtemperatur nach dem Waschen der Platten. Anschließend wurde in jedes Well der erneut gewaschenen Platte 100 µl Streptavidin-Peroxidase (2 µg/ml in PBS/1% (w/v) BSA) gegeben und für weitere 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden erneut gewaschen und die Entwicklung des ELISA erfolgte mit dem Substrat *ortho*-Phenylendiamin in Zitratpuffer (100 µl/Well). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2n H₂SO₄ abgestoppt und die Platte im ELISA-Reader gemessen (492 nm/620 nm)

Als Standard diente eine Verdünnungsreihe des jeweiligen rekombinanten Zytokins. Die Anfangskonzentration der jeweiligen Verdünnungsreihe ist in Tabelle 5 angegeben.

Interleukin-10 wurde mit einem kommerziell erhältliche OptEIA-Kit (Pharmingen) entsprechend des beigefügten Protokolles gemessen.

Tabelle 5: Übersicht über die für die Zytokin-ELISA verwendeten Antikörper, Puffer und Standardkonzentrationen. Der in Klammern gefasste Buchstabe nach der Konzentration des Primärantikörpers bezeichnet den jeweiligen Beladungspuffer, z.B. (A) Beladungspuffer A usw.; siehe 2.1.4.3

Zytokin	Primärantikörper	Konzentration	Sekundärantikörper	Konzentration	Standard
IL-1β	MAB401	2 µg/ml (A)	BAF401	0,05 µg/ml	1000 pg/ml
IL-2	JES6-1A12	1 µg/ml (C)	JES6-5H4	0,05 µg/ml	2000 pg/ml
IL-4	BVD4-1D11	2 µg/ml (A)	BVD6-24G2	1 µg/ml	200 pg/ml
IL-6	MP5-20F3	2 µg/ml (A)	MP5-32C11	0,25 ng/ml	10000 pg/ml
IFN-γ	R4-6A2	1 µg/ml (C)	XMG1.2	0,5 µg/ml	3000 pg/ml
TNF-α	G281-2626	6 µg/ml (B)	MP6-XT3	0,5 µg/ml	2500 pg/ml

3.9 Durchflusszytometrie

Grundlagen

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung von Einzelzellen in Suspension anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften und der Fluoreszenzemission fluorochrommarkierter Antikörper, mit denen die Zellen zuvor gefärbt worden sind. Zur Analyse werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom in eine Messküvette eingeführt, wo sie von fokussiertem Laserlicht verschiedener Anregungswellenlänge (Argon-Laser 488 nm, Helium-Neon-Laser 633 nm) durchstrahlt werden. Die Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden gefiltert und in Fotoverstärkungsröhren verstärkt. Folgende Parameter werden von jeder Zelle analysiert:

- Forward Scatter (FSC, Vorwärtsstreulicht); proportional zur Größe der Zelle
- Side Scatter (SSC, Seitwärtsstreulicht); proportional zur Granularität der Zelle
- FL1 (Fluoreszenzintensität 1); 530/30 nm-Bandpassfilter z.B. für FITC
- FL2 (Fluoreszenzintensität 2); 585/42 nm-Bandpassfilter z.B. für PE
- FL3 (Fluoreszenzintensität 3); 670 nm-Langpassfilter z.B. für PE-Cy5
- FL4 (Fluoreszenzintensität 4); 661/16 nm-Bandpassfilter z.B. für APC

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden mit einem FACS Calibur-Zytometer durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software WinMDI (<http://www.scripps.edu>).

Oberflächenfärbungen

Zur Färbung von Oberflächenantigenen wurden verschiedene fluorochrom- oder biotinkonjugierte Antikörper verwendet (siehe 2.1.5). Die Zellen wurden in 100 µl FACS®-Puffer mit dem jeweiligen Antikörper in der optimalen Verdünnung für 15 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend zweimal mit FACS®-Puffer gewaschen und entweder sofort gemessen oder mit 2% Formalin in PBS fixiert. Als Sekundärreagent für biotinylierte primäre Antikörper diente Streptavidin-APC. Beim Messen von unfixierten Zellen wurden tote Zellen durch die Zugabe von Propidiumjodid von der Analyse ausgeschlossen. Als Negativkontrolle dienten unspezifische, aber mit dem gleichen Fluorochrom markierten Antikörper.

Alle Arbeitsschritte und Zentrifugationen wurden auf Eis oder bei 4°C im Dunkeln durchgeführt, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden.

IL-10-Sekretions-Assay

Zur Messung der antigenspezifischen IL-10-Produktion in CD4⁺ T-Zellen wurde ein IL-10-Sekretionsassay durchgeführt. Dieser Sekretionsassay ist ein hochsensitives Verfahren (ca. 1000x empfindlicher als intrazelluläre Färbung) zur Analyse der antigenspezifischen Zytokinproduktion lebender Zellen. Die Oberfläche der zu analysierenden Zellen wird nach deren Stimulation mit einer Matrix beladen, die das jeweilige Zytokin spezifisch bindet (Konjugate aus anti-CD45- und anti-Zytokin-mAk). Anschließend erfolgt eine Sekretionsperiode, bei der das Zytokin von der Matrix gebunden wird. Hierbei ist durch entsprechende Einstellung der Zelldichte darauf zu achten, dass es nicht zu einer Kreuzkontamination der Zellen untereinander und damit zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommt. Die auf der Zelloberfläche gebundenen Zytokin-Antikörper-Komplexe werden anschließend durch fluorochrom-

markierte mAk detektiert. Nach Färbung von Oberflächenmolekülen (z.B. CD4, B220) können die Zellen durchflusszytometrisch analysiert werden. Es ist auch möglich, die zytokinproduzierenden Zellen mit anti-Fluorochrom-Microbeads zu isolieren.

Milz- und Lymphknotenzellen aus den drainierenden Lymphknoten von AIA-Tieren wurden für 18 Stunden in komplettem RPMI-Medium (hierbei wurde der FCS-Anteil durch 1% Mausserum ersetzt) mit 25 µg/ml mBSA inkubiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte bzw. ConA-stimulierte Zellen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und 10^6 Zellen in 90 µl kaltem MACS[®]-Running-Puffer resuspendiert und mit 10 µl Catch-Reagent für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde 1 ml warmes Medium hinzugegeben und die Zellen für 45 Minuten bei 37°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert (Sekretionsperiode). Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen und mit dem anti-IL-10-PE-Detektionsantikörper, anti-CD4-FITC und anti-B220-Biotin und Streptavidin-APC gefärbt. Die Zellen wurden sofort gemessen. Tote Zellen wurden durch die Zugabe von Propidiumjodid von der Analyse ausgeschlossen.

3.10 Darstellung der Ergebnisse und statistische Analyse

Sofern nicht anders angegeben, sind in der vorliegenden Arbeit alle Messwerte als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt.

Die Prüfung der Messergebnisse und Bewertung der Arthritisschwere (Kniegelenkschwellung und Histologie) auf statistisch signifikante Gruppenunterschiede erfolgte mit dem Mann-Whitney *U*-Test. Alle übrigen Messungen wurden mit Student's *t*-Test untersucht. Für die Berechnungen wurde das Programm SPSS 10.0.7. (SPSS Inc., Chicago) eingesetzt.. Alle Tests wurden zweiseitig ausgeführt. Eine *p*-Wert kleiner als 0,05% wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Darstellung der signifikanten Unterschiede erfolgt in den Abbildungen mit Symbolen oder im Text.

4 Ergebnisse

4.1 Depletion von CD25-positiven Zellen *in vivo*

4.1.1 Stärke und Dauer der Depletion

Um die Rolle von CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen in der AIA zu untersuchen, wurde zunächst versucht, diese Zellen durch Injektion eines anti-CD25-Antikörpers zu depletieren. Wie in der Literatur beschrieben (Onizuka et al. 1999, Suttmüller et al. 2001, Jones et al. 2002, McHugh und Shevach 2002, Morgan et al. 2003, Suvas et al. 2003) wurde zur Depletion von CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen auch in den hier beschriebenen Experimenten der Klon PC61 eingesetzt. Je 0,5 mg des Antikörpers oder Ratten-IgG als Kontrolle wurden vier und zwei Tage vor der Arthritisinduktion, d.h. zehn bzw. zwölf Tage nach der zweiten Immunisierung, intraperitoneal injiziert. Das Ausmaß der Depletion wurde zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion (d 0, d.h. zwei bzw. vier Tage nach mAk-Behandlung) durchflusszytometrisch bestimmt. Diese Messung erfolgte unter Verwendung eines nicht kreuzreaktiven Antikörpers (Klon 7D4).

Durch die Behandlung mit anti-CD25 wurde der Anteil der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen an den Gesamt-CD4-Zellen in der Milz um 70% und in den peripheren Lymphknoten der behandelten Tiere um 50% im Vergleich zu Kontrolltieren verringert. Zellen mit einer hohen CD25-Expression waren überproportional stark von der Depletion betroffen. So wurde die Anzahl der CD25^{high} Zellen in der Milz um 90% auf 10% verringert, während Zellen mit einer intermediären CD25-Expression nur auf 40% verringert wurden. Noch ausgeprägter war diese selektive Depletion in den Lymphknoten; hier war die Anzahl der CD25^{high} Zellen auf 5% im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert, während die Anzahl der CD25^{int} Zellen konstant blieb (Abbildung 8).

Um zu überprüfen, wie stabil der Effekt dieser T_{reg}-Depletion war, wurden der Anteil der CD4⁺CD25⁺ Zellen an den Milz- und Lymphknotenzellen auch am Zeitpunkt der Beendigung des Experimentes (d 14) gemessen. Überraschenderweise zeigte sich, dass in der Milz von anti-CD25-behandelten Tieren wieder nahezu die gleiche Menge CD4⁺CD25⁺ Zellen gefunden wurde wie in der Kontrollgruppe, während in den peripheren Lymphknoten die Anzahl auf 70% reduziert blieb. Diese Repopulation der Milz mit CD4⁺CD25⁺ Zellen ist insofern überraschend, weil der Depletionseffekt in der Literatur als bis zu 30 Tagen anhaltend beschrieben wurde (Suttmüller et al. 2001, Morgan et al. 2003). Da CD25 nicht nur auf T_{reg}-Zellen, sondern aktivierungs-

abhängig auch auf normalen T-Zellen exprimiert wird kann, ist es möglich, dass es sich um solche normalen aktivierten T-Zellen handelt.

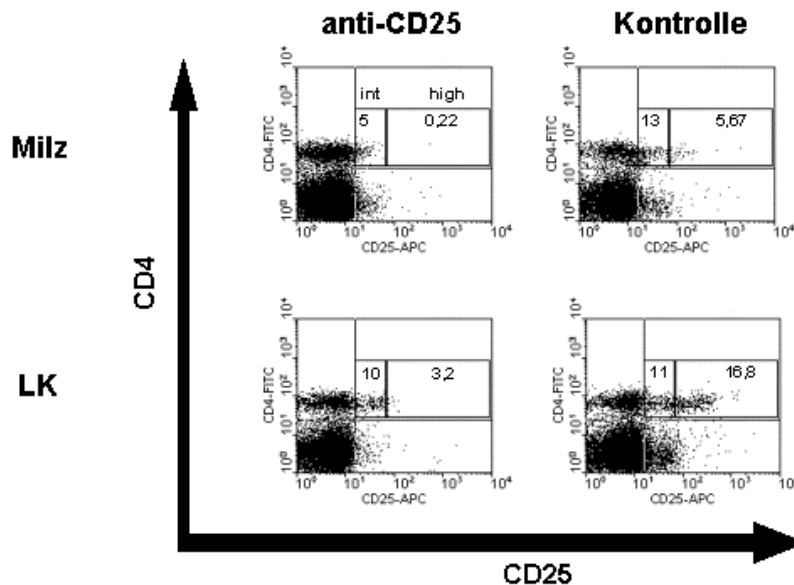


Abbildung 8: Depletion von $CD4^+CD25^+$ Zellen durch Behandlung mit anti-CD25, gemessen am Tag 0 der AIA. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der $CD25^{high}$ und $CD25^{int}$ (high bzw. int.) an den Gesamt-CD4-Zellen an.

4.1.2 Effekt auf die Arthritisschwere

Die Induktion der AIA durch die intraartikuläre Antigeninjektion führte in den CD25-depletierten Tieren zu einer stärkeren Gelenkschwellung. Diese Exazerbation der Arthritis trat bereits in der akuten Phase auf und blieb über den gesamten Verlauf der Experimente bestehen (Abb. 9A). Die histologische Untersuchung der arthritischen Kniegelenke zeigte eine deutliche Verstärkung der synovialen Hyperplasie sowie der Infiltration der Synovialmembran (Abb. 9B-D). In einigen Tieren waren sogar noch Zeichen von akuter Entzündung, wie granulozytäre Infiltration nachweisbar.

Um zu überprüfen, ob diese verstärkte Arthritis tatsächlich auf das Fehlen von $CD4^+CD25^+$ Zellen zurückzuführen war und nicht auf die Depletion anderer CD25-exprimierender Zellen wie B-Zellen oder $CD8^+$ T-Zellen, wurden $CD4^+CD25^+$ Zellen aus naiven C57Bl/6-Mäusen isoliert, präaktiviert und in anti-CD25-behandelte Tiere transferiert. Um eine Depletion der transferierten Zellen durch noch vorhandenen anti-CD25-Antikörper zu vermeiden, erfolgte der Transfer am Tag 7 der AIA. Bei den Tieren, deren T_{reg} -Funktion durch diesen Transfer wiederhergestellt wurde, zeigte sich eine geringe Abnahme der Gelenkschwellung bis auf das Niveau der Kontrollgruppe. Die histologische Untersuchung der Gelenke ergab eine Tendenz zu

einer verringerten Arthritisschwere, die allerdings nicht statistisch signifikant war (Abb. 9A und B).

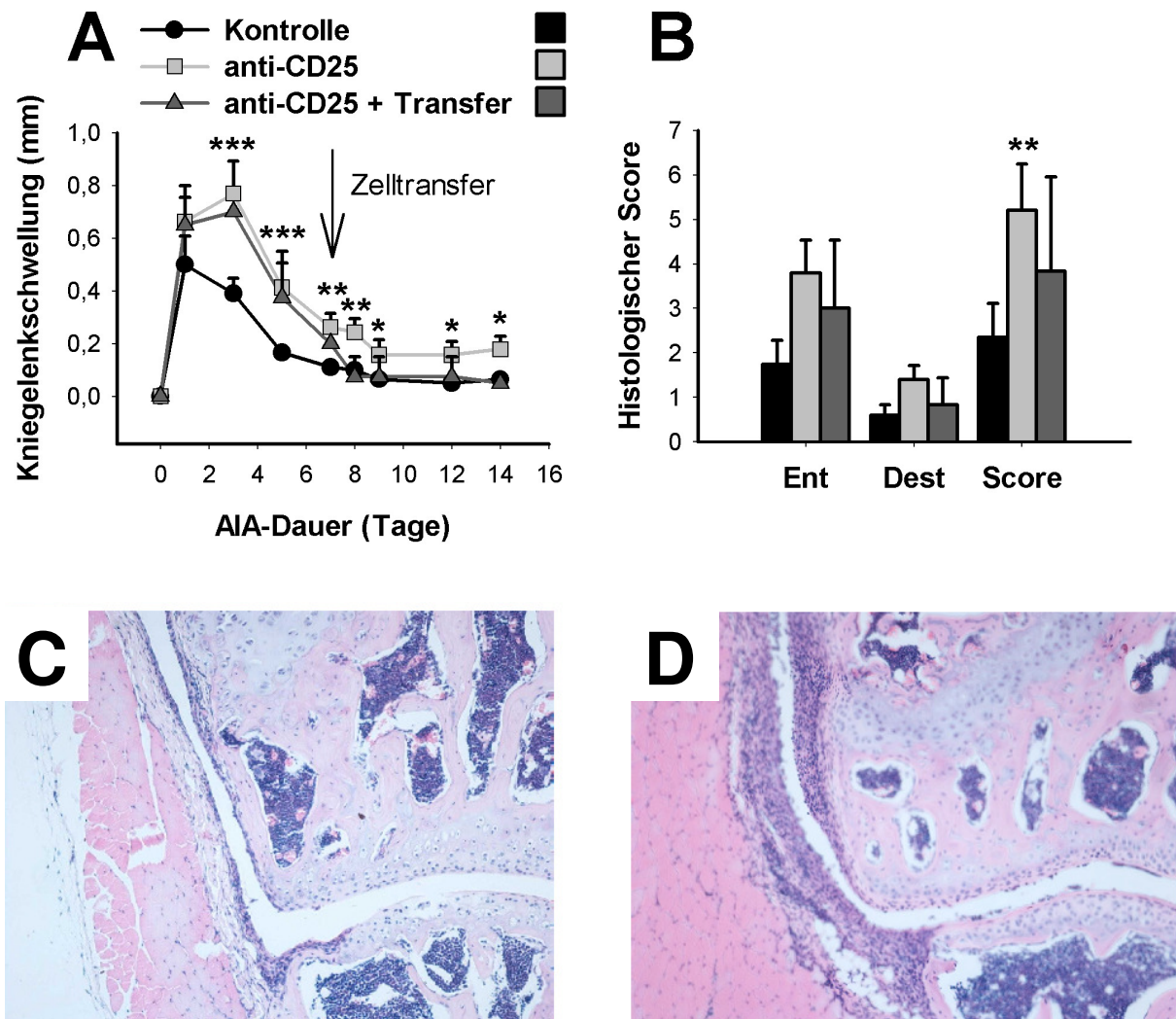


Abbildung 9: Klinische und histologische Schwere der AIA in anti-CD25-behandelten bzw. Kontroll-Tieren. Als klinischer Verlaufparameter diente die Gelenkschwellung (A). Nach 14 Tagen Arthritisverlauf wurden die histologischen Veränderungen in den Kniegelenken semiquantitativ bewertet (B). Repräsentative mikrophotographische Aufnahmen eines Kniegelenkes aus einem Kontroll- und einem anti-CD25-behandelten Tier (C und D). Es wurden in 2 unabhängigen Experimenten pro Gruppe 10 (anti-CD25; Kontrolle) oder 4 (anti-CD25 + Transfer) Tiere untersucht (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrollgruppe; U-Test).

4.1.3 Beeinflussung der zellulären und humoralen Immunantwort

Um den Effekt der anti-CD25-Behandlung auf das Immunsystem der Tiere zu untersuchen, wurden Analysen der zellulären und humoralen Immunität durchgeführt.

Die Untersuchung der zellvermittelten Immunantwort gegen das zur Immunisierung und Arthritisinduktion verwendete Antigen mBSA als auch gegen knorpelmatrix-

spezifische Autoantigene wie Kollagen Typ II und Proteoglykane erfolgte mit verschiedenen Methoden *in vivo* und *in vitro*. Die Stärke der zellulären Antwort gegen mBSA *in vivo* wurde durch eine verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion getestet. Hierzu erfolgte am Tag 7 der AIA eine Applikation des Antigens in die Ohrhaut und die resultierende Schwellung des Ohres wurde mittels Schnelltester nach 24 und 48 Stunden gemessen. In den mit anti-CD25-mAk behandelten Tieren fand sich eine signifikante Erhöhung der Ohrschwellung gegenüber Ratten-IgG-behandelten Kontrolltieren (Abb. 10A).

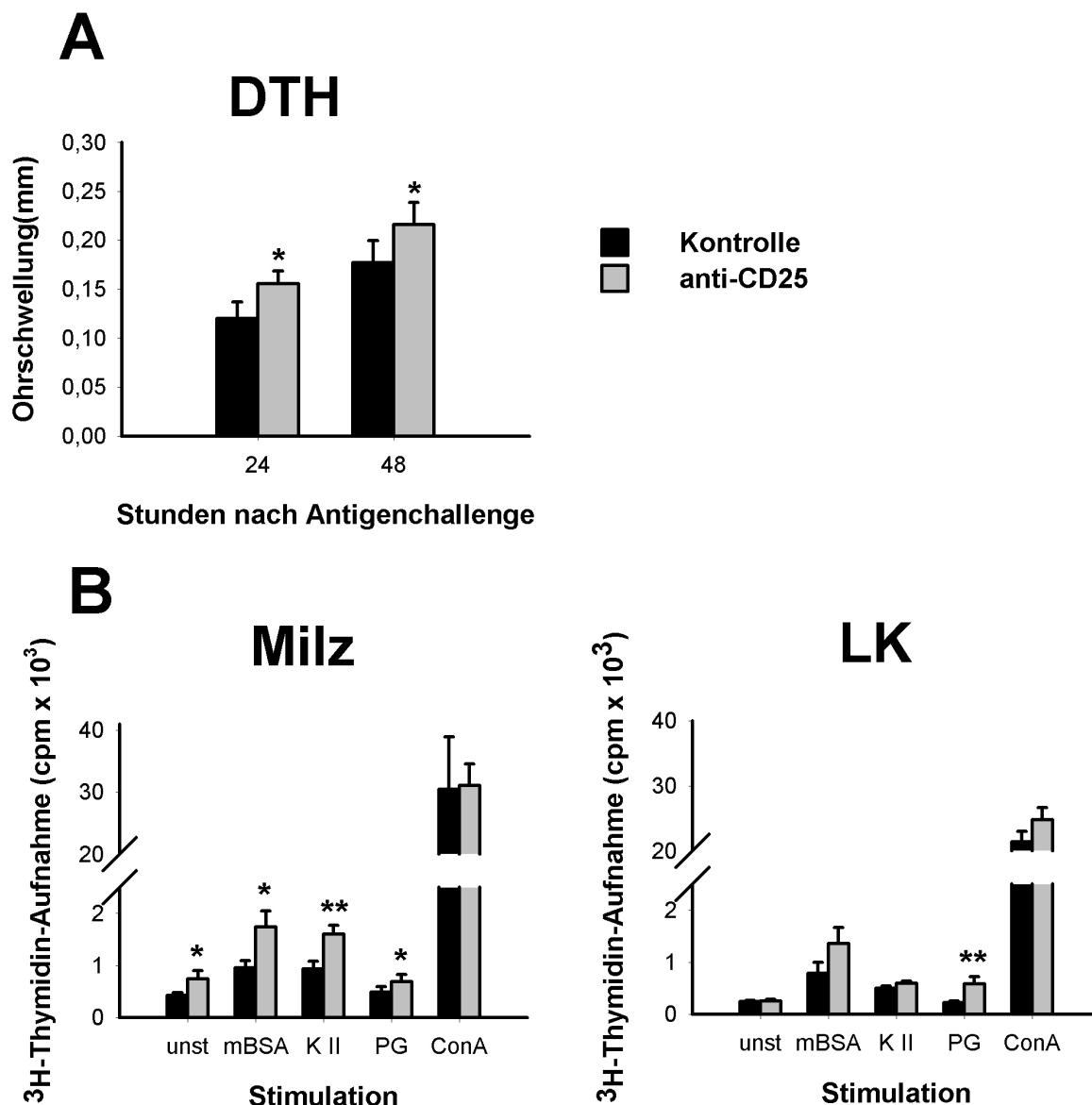


Abbildung 10: Zelluläre Immunreaktivität gemessen als verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion (DTH) *in vivo* (A) und als Proliferation von *in vitro* restimulierten Milz- und Lymphknotenzellen (B). Die Restimulation erfolgte mit Medium (unst), 25 µg/ml mBSA, 50 µg/ml Kollagen Typ II (K II) oder Proteoglykan (PG) bzw. 5 µg/ml Concanavalin A (Con A). Es wurden jeweils 10 Tiere pro Gruppe in zwei unabhängigen Experimenten untersucht. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrollgruppe)

Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine verstärkte mBSA-spezifische Immunantwort. Um dies zu bestätigen, wurde aus Milzen und drainierenden Lymphknoten (rechts inguinal und popliteal) Einzelzellsuspensionen präpariert, mit den Antigenen mBSA sowie Kollagen Typ II und Proteoglykanen restimuliert und die DNA-Syntheserate und damit die Proliferation der Zellen über den Einbau von ^3H -Thymidin gemessen. Kollagen Typ II und Proteoglykane sind Autoantigene, die vorwiegend im Gelenkknorpel vorkommen. Somit kann durch die Einbeziehung dieser Antigene in die Messungen auch untersucht werden, ob es durch eine anti-CD25-Behandlung zu einer verstärkten Autoreaktivität kommt. Diese Restimulation führte sowohl in Milz- als auch in den Lymphknotenzellen von anti-CD25-behandelten Tieren zu einer stärkeren Proliferation als in den Kontrolltieren. Dieser Effekt war in den Milzzellen deutlicher ausgeprägt als in den Lymphknotenzellen, da hier für alle Antigenstimulationen signifikant unterschiedliche Gruppenunterschiede gefunden worden, während bei den Lymphknotenzellen meist nur numerische Unterschiede nachweisbar waren (Abb. 10B).

Die Milz- und Lymphknotenzellen aus mit anti-CD25-mAK behandelten Tieren proliferierten bereits spontan, d.h. ohne Stimulation deutlich stärker als Zellen aus Kontrolltieren (1,7-3,7 mal stärker, $p < 0,05$). Wegen dieser signifikant unterschiedlichen Background-Proliferation in den verschiedenen Gruppen wurden zur genauen Beurteilung der antigenspezifischen Proliferation Stimulationsindizes für die einzelnen Experimente berechnet (Wert für die jeweilige Stimulation dividiert durch den Wert für die Background-Proliferation). Diese Stimulationsindizes (SI) sind in Tabelle 6 dargestellt. In den mit anti-CD25-mAk behandelten Mäusen kam es in einem Experiment zu keiner oder nur geringen Erhöhung des SI (Exp. 2), während in einem anderen Experiment (Exp. 1) der SI aufgrund der hohen spontanen Proliferation in diesen Tieren sogar signifikant verringert war. Diese spontane Proliferation ist als Beleg dafür zu werten, dass es in den anti-CD25-behandelten Tieren mehr aktivierte T-Zellen gibt als in den Kontrolltieren, und dies sogar noch 14 Tage nach der intraartikulären Antigeninjektion. Insgesamt bedeutet dies, dass die Abwesenheit von $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T_{reg} -Zellen sowohl zu einer verstärkten antigenspezifischen Immunantwort führen kann, darüber hinaus aber auch zu einer prolongierten T-Zell-Aktivierung führt, die wiederum für die Exazerbation der AIA verantwortlich sein könnte.

Tabelle 6: Vergleich von Stimulationsindizes von Milz- und Lymphknotenzellen, die aus anti-CD25-beziehungsweise Ratten-IgG-behandelten Tieren isoliert und mit verschiedenen Antigenen (mBSA, Kollagen Typ II (K II), Proteoglykane (PG), purified protein derivate (PPD) von *M. tuberculosis* oder polyklonal (Concanavalin A (ConA) oder anti-CD3 (CD3)) restimuliert wurden.

Milz		mBSA	K II	PG	PPD	ConA	CD3
Experiment 1	Kontrolle	4,6 ± 0,5	n.d.	n.d.	7,7 ± 1,3	n.d.	26,6 ± 8,2
	anti-CD25	3 ± 0,3 **	n.d.	n.d.	3,3 ± 0,4 **	n.d.	15,3 ± 6,0
Experiment 2	Kontrolle	2,3 ± 0,3	2,1 ± 0,13	1,4 ± 0,2	n.d.	67,1 ± 10,6	n.d.
	anti-CD25	2,8 ± 0,8	2,6 ± 0,53	1,5 ± 0,2	n.d.	49,8 ± 8,7	n.d.

Lymphknoten		mBSA	K II	PG	PPD	ConA	CD3
Experiment 1	Kontrolle	11,8 ± 2,5	n.d.	n.d.	22,7 ± 5,6	n.d.	69 ± 20,6
	anti-CD25	8,6 ± 2,47	n.d.	n.d.	9,5 ± 3 **	n.d.	15 ± 4,7 *
Experiment 2	Kontrolle	2,9 ± 0,5	2,2 ± 0,2	1 ± 0,1	n.d.	95,9 ± 10	n.d.
	anti-CD25	5,2 ± 1 *	2,5 ± 0,23	2,5 ± 0,67 *	n.d.	101 ± 7,3	n.d.

n. d. nicht durchgeführt, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Auch die Zytokinproduktion der Milz- und Lymphknotenzellen wurde analysiert. Diese Untersuchungen erfolgten mit der ELISPOT-Technologie, die die direkte Quantifizierung von antigenspezifischen zytokinproduzierenden Zellen erlaubt. Mit diesen Analysen konnten die Ergebnisse der Proliferationsmessung voll bestätigt werden. In den Milzen und Lymphknoten der CD25-depletierten Tiere ließ sich eine höhere Anzahl mBSA-spezifischer zytokinproduzierender Zellen nachweisen (Abb. 11). Auch hier war der Effekt in den Milzzellen ausgeprägter als in den Lymphknotenzellen und zusätzlich fanden sich in den Milzen deutlich mehr spontan (ohne Stimulation) zytokinproduzierende Zellen.

Zusätzlich zu den ELISPOT-Analysen wurde auch die Menge der Zytokine in Kulturüberständen von *in vitro* restimulierten Milz- und Lymphknotenzellen mittels ELISA bestimmt. Diese Messungen bestätigten die Befunde aus den ELISPOT-Analysen weitgehend (Tabelle 7).

In all diese Untersuchungen wurden sowohl T_H1 -Zytokine (IL-2, IFN- γ) als auch T_H2 -Zytokine (IL-4, IL-5) einbezogen, um die Balance zwischen diesen T-Zell-Subpopulationen beurteilen zu können. Bei allen Messungen waren die Zytokine dieser beiden funktionell unterschiedlichen T-Zellpopulationen erhöht, was zeigt, dass die T_{reg} -Zellen nicht selektiv einen der beiden Subsets hemmen und so über eine Modulation der T_H1/T_H2 -Balance die Pathogenese der AIA beeinflussen.

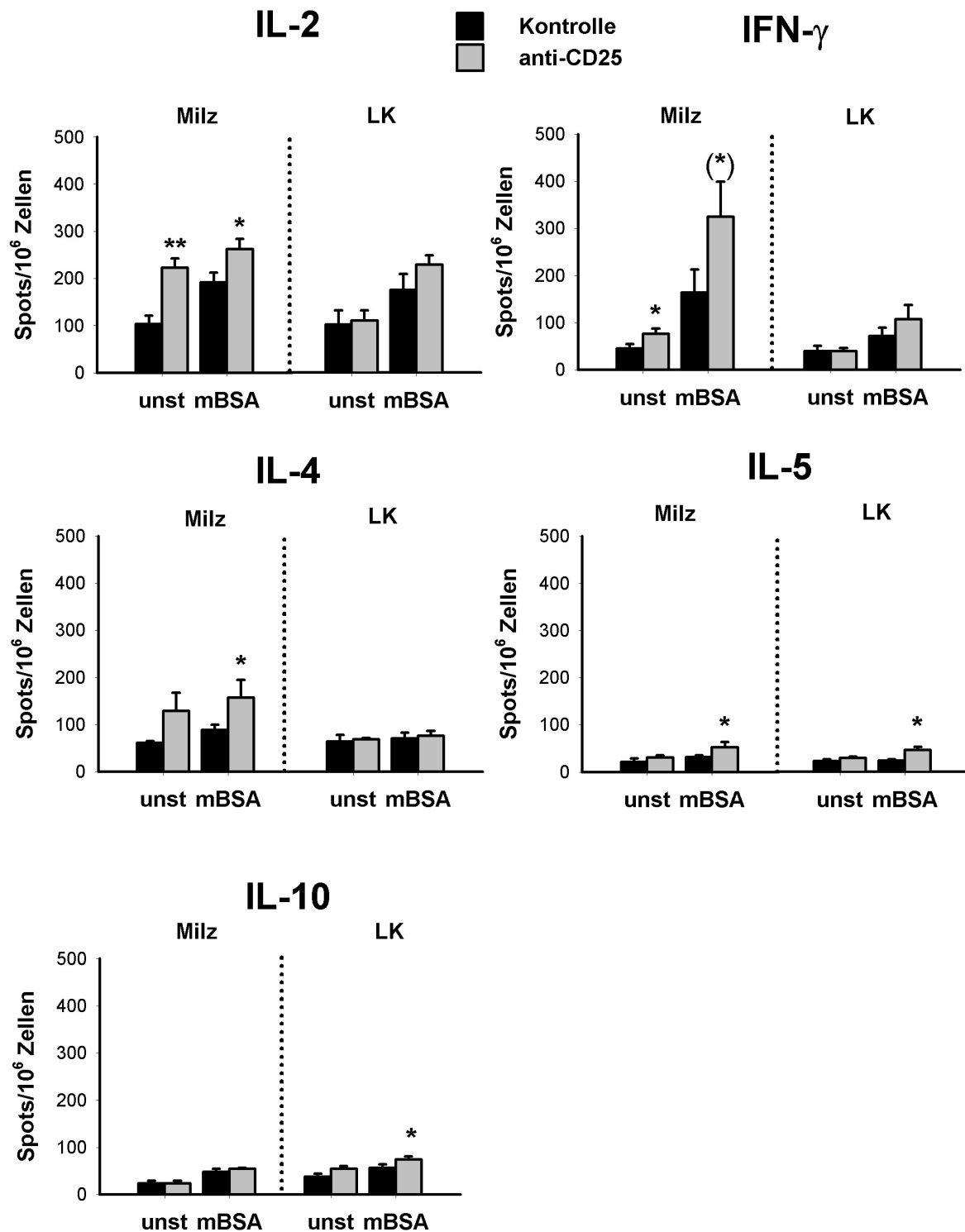


Abbildung 11: Zytokinproduktion von Milz- und Lymphknotenzellen (LK) aus arthritischen Tieren (d14), die mit anti-CD25 oder Kontroll-IgG behandelt wurden. Es wurden 6 Tiere pro Gruppe in 2 unabhängigen Experimenten untersucht, ein repräsentatives Experiment ist hier gezeigt. ((*) $p < 0,1$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrollgruppe)

Interessanterweise war sogar die Menge des IL-10 leicht erhöht. Dies steht im Widerspruch zu einer kürzlich publizierten Arbeit, bei der im Modell der EAE durch eine anti-CD25-Behandlung die antigenspezifische IL-10-Produktion verringert wurde

(Zhang et al. 2004). Die Autoren interpretierten diesen Befund dahingehend, dass $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen die Hauptquelle von IL-10 sein sollen. Die direkte Quantifizierung von IL-10-produzierenden Zellen in C57Bl/6-Mäusen mit AIA mittels Zytokin-Sekretionsassay zeigt (Abb. 24 und eigene, bisher unveröffentlichte Daten), dass die Frequenz von IL-10-produzierenden $CD4^+$ Zellen sehr gering ist gegenüber IL-10-produzierenden B-Zellen. Hauptquelle des IL-10 im AIA-System sind daher wahrscheinlich B-Zellen oder Makrophagen, die in den CD25-depletierten Tieren nicht mehr durch T_{reg} -Zellen inhibiert werden und damit zur erhöhten IL-10-Produktion beitragen.

Tabelle 7: Zytokingehalt in den Kulturüberständen von Milz- und Lymphknotenzellen aus arthritischen Tieren (d14), angegeben in pg/ml. Pro Gruppe wurden 10 Tiere untersucht.

Milz	unstimuliert		mBSA	
	Kontrolle	anti-CD25	Kontrolle	anti-CD25
IL-2	165 ± 30	304 ± 30 **	363 ± 12	531 ± 44 **
IFN-γ	53 ± 22	231 ± 81 *	752 ± 184	1241 ± 194 *
IL-4	8 ± 2	27 ± 4 *	25 ± 5	46 ± 6 *
IL-5	30 ± 7	32 ± 4	58 ± 6	76 ± 12
IL-10	34 ± 15	168 ± 49 *	203 ± 50	598 ± 220 (*)

Lymphknoten	unstimuliert		mBSA	
	Kontrolle	anti-CD25	Kontrolle	anti-CD25
IL-2	64 ± 13	165 ± 30 **	163 ± 27	245 ± 112 *
IFN-γ	82 ± 63	162 ± 69	416 ± 146	1610 ± 222 ***
IL-4	4 ± 1	16 ± 4 *	25 ± 6	25 ± 4
IL-5	29 ± 5	49 ± 10 (*)	12 ± 4	74 ± 17 **
IL-10	17 ± 7	29 ± 12 *	230 ± 147	261 ± 55

(*) $p < 0,1$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Zur Untersuchung der humoralen Immunantwort wurde die Menge des spezifischen Immunglobulin G gegen mBSA, Kollagen Typ I, Kollagen Typ II und Proteoglykane im Serum der Tiere mittels ELISA gemessen. In den CD25-depletierten Tieren war die Menge dieser IgG deutlich und statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Abb. 12).

4.1.4 Zusammenfassung

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von mBSA/CFA-immunisierten C57Bl/6-Mäusen mit einem anti-CD25-Antikörper zu einer deutlichen Reduktion von CD25-exprimierenden Zellen führt. Die AIA in diesen Tieren war deutlich exazerbiert. Diese Exazerbation konnte durch den Transfer von

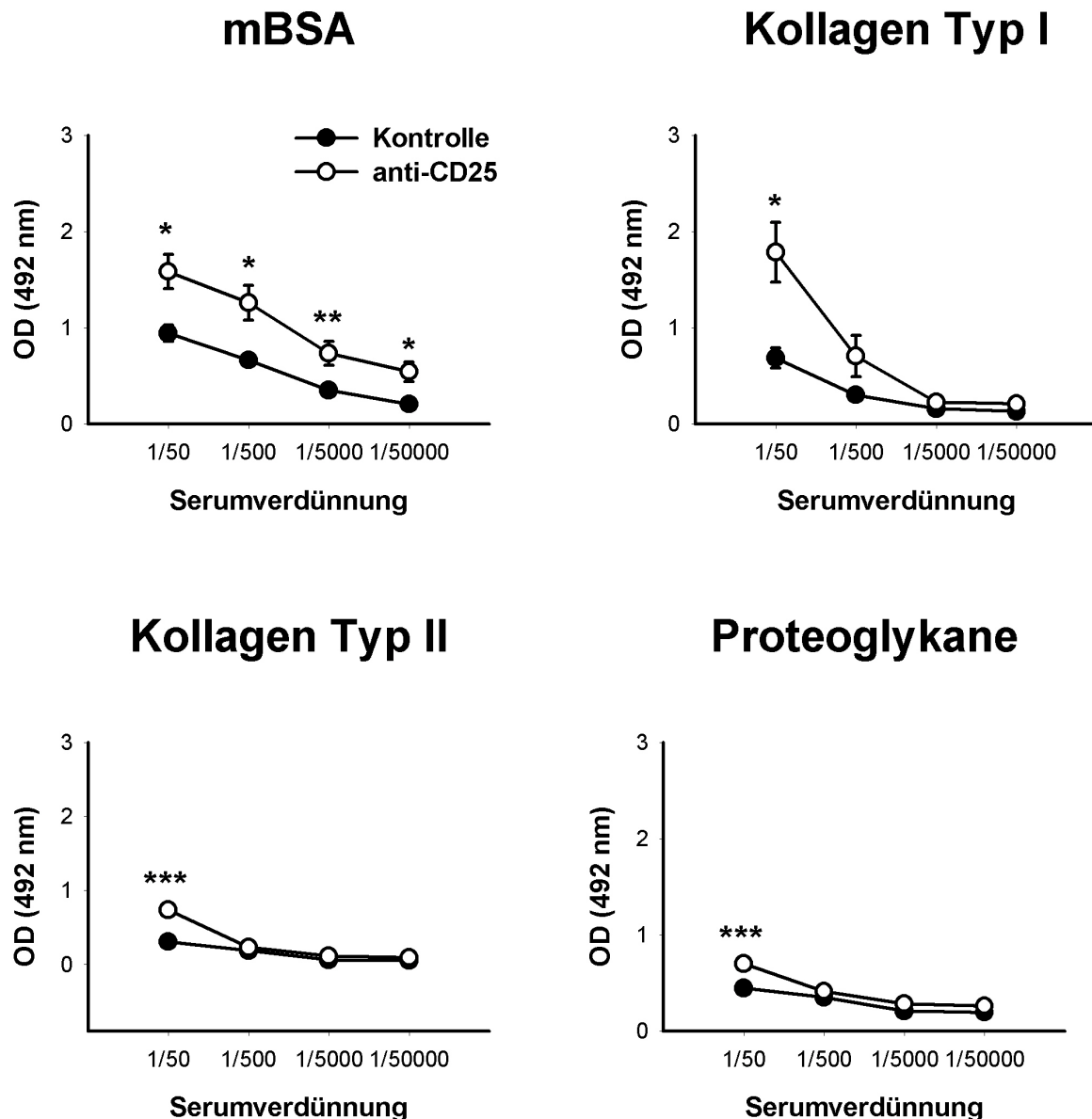


Abbildung 12: IgG gegen mBSA, Kollagen Typ I, Kollagen Typ II und Proteoglykane im Serum arthritischer Tiere (d14), die mit anti-CD25 oder Kontroll-IgG behandelt wurden. 10 Tiere pro Gruppe wurden untersucht, gezeigt sind die Daten eines repräsentativen Experimentes von zwei durchgeführten. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ gegenüber Kontrollgruppe)

regulatorischen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen teilweise rückgängig gemacht werden. Die verstärkte Arthritis in den CD25-depletierten Tieren war begleitet von einer verstärkten zellulären Immunreaktivität gegenüber dem Immunisierungsantigen mBSA sowie knorpelmatrixspezifischen Autoantigenen *in vivo* und *in vitro*. Diese Erhöhung beruhte auf einer erhöhten Frequenz der antigenspezifischen T-Zellen als auch auf einer prolongierten T-Zell-Aktivierung. Eine Verschiebung des T_H1/T_H2 -Gleichgewichtes konnte dabei nicht festgestellt werden, die Aktivität beider Subsets war erhöht. Auch die humorale Immunantwort gegen mBSA und die knorpelmatrixspezifischen Autoantigene Kollagen Typ I, Typ II und Proteoglykane war in den CD25-depletierten Tieren erhöht.

4.2 Transfer von CD4⁺CD25⁺ Zellen

Um die Rolle von CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen in der AIA weiter zu charakterisieren, wurde eine Reihe von Transferexperimenten durchgeführt. Hierbei wurden CD4⁺CD25⁺ Zellen in mBSA/CFA-immunisierte Tiere zum Zeitpunkt der AIA-Induktion transferiert. In einem initialen Experiment wurden dafür CD4⁺CD25⁺ Zellen aus naiven Donoren immunomagnetisch isoliert. Die so isolierten Zellen wurden zunächst funktionell charakterisiert. Im Gegensatz zu CD4⁺CD25⁻ Zellen proliferierten CD4⁺CD25⁺ Zellen nach Stimulation mit immobilisiertem anti-CD3 mAK selbst nicht, und waren in der Lage in Kokultur die Proliferation von CD4⁺CD25⁻ Zellen zu inhibieren. Die Verhinderung des direkten Zellkontaktes zwischen CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ Zellen mittels Transwell™-Einsatzes konnte diese Inhibition teilweise aufheben (Abb. 13A).

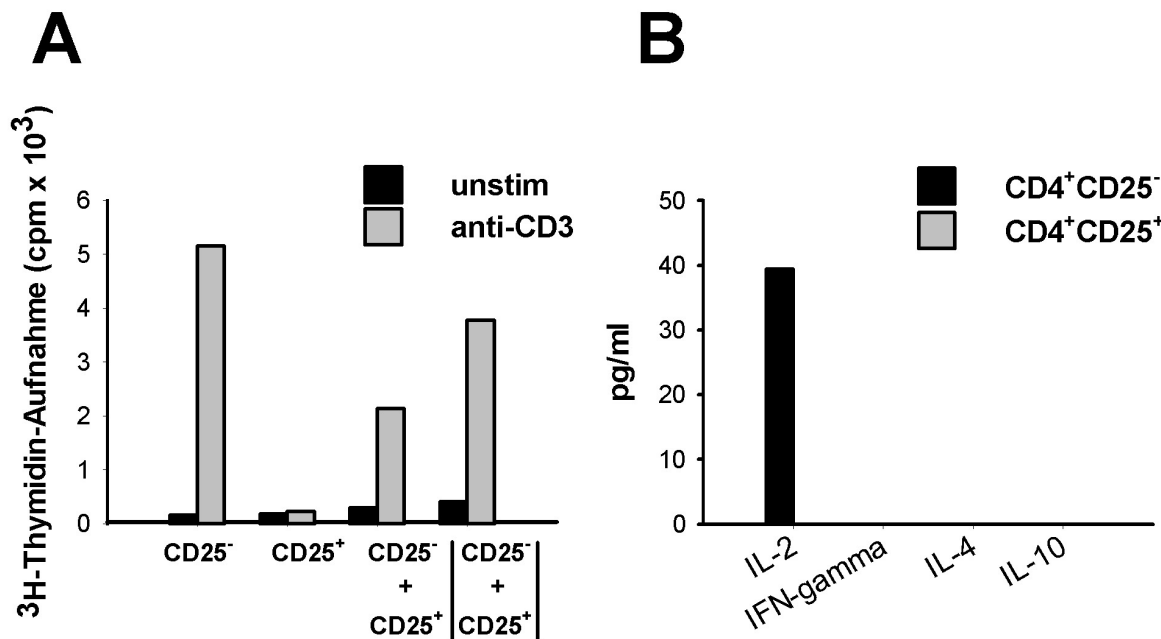



Abbildung 13: Charakterisierung von CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ Zellen aus naiven Tieren *in vitro*. A: 2x10⁵ CD4⁺CD25⁻ (CD25-) oder CD4⁺CD25⁺ (CD25+) Zellen oder 2x10⁵ CD4⁺CD25⁻ Zellen zusammen mit 1x10⁵ CD4⁺CD25⁺ Zellen (CD25- + CD25+) pro Well einer 96-Well-Platte wurden für 72 h ohne (unstim) oder in Gegenwart von anti-CD3 (1 µg/ml, platebound) kultiviert und die Proliferation über den Einbau von ³H-Thymidin bestimmt. Im Gegensatz zu CD4⁺CD25⁻ Zellen proliferieren CD4⁺CD25⁺ Zellen nur sehr gering und hemmen in Kokultur die Proliferation der CD4⁺CD25⁻ Zellen. Dieser Effekt kann durch die Verhinderung direkten Zellkontaktes durch Trennung der Zellpopulationen mittels Transwell™-Einsätzen () teilweise rückgängig gemacht werden. B: CD4⁺CD25⁻ oder CD4⁺CD25⁺ Zellen wurden für 24 Stunden mit Medium (unstim) oder Concanavalin A (ConA; 5 µg/ml) stimuliert und anschließend der Gehalt an Zytokinen im Kulturüberstand gemessen. Die Daten eines repräsentativen von drei durchgeführten Experimenten sind gezeigt.

Auch die Zytokinproduktion beider Zellpopulationen wurde durch Messung von Zytokinen in Kulturüberständen nach 24 Stunden Stimulation mit Concanavalin A

quantifiziert. Hierbei zeigte sich, dass nur die $CD4^+CD25^-$ Zellen, nicht aber $CD4^+CD25^+$ Zellen, IL-2 produzieren konnten. Andere Zytokine wurden nicht detektiert. Damit ist gezeigt, dass die hier verwendeten $CD4^+CD25^+$ Zellen die typischen funktionellen Eigenschaften natürlich vorkommender T_{reg} -Zellen haben: fehlende Proliferation und IL-2-Produktion, Suppression der Proliferation kokultivierter $CD4^+CD25^-$ Zellen.

4.2.1 Transfer von frisch isolierten Zellen

Direkt nach der Isolation wurden 2×10^6 $CD4^+CD25^+$ Zellen, $CD4^+CD25^-$ Zellen oder 200 μ l PBS in die Rezipienten transferiert und die Arthritis durch die intraartikuläre Antigeninjektion ausgelöst. In den Rezipienten von $CD4^+CD25^+$ Zellen kam es zu einer Reduktion der klinischen Schwere der AIA (Gelenkschwellung), beginnend am Tag 3 der Arthritis. Dieser Gelenkschwellungsunterschied persistierte bis zum Ende des Experimentes am Tag 14 (Abb. 14A). Der Transfer von 2×10^6 $CD4^+CD25^-$ Zellen in die Kontrollgruppe führte nicht zu einer Verringerung der Arthritisschwere, sondern sogar zu einer gering verstärkten Gelenkschwellung in der akuten Phase der AIA. Die histologische Untersuchung der Gelenke zeigte, dass es durch den Transfer von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen zu einer Verringerung der histologischen Arthritisschwere kam, die aufgrund der begrenzten Anzahl der Versuchstiere keine statistische Signifikanz erreichte.

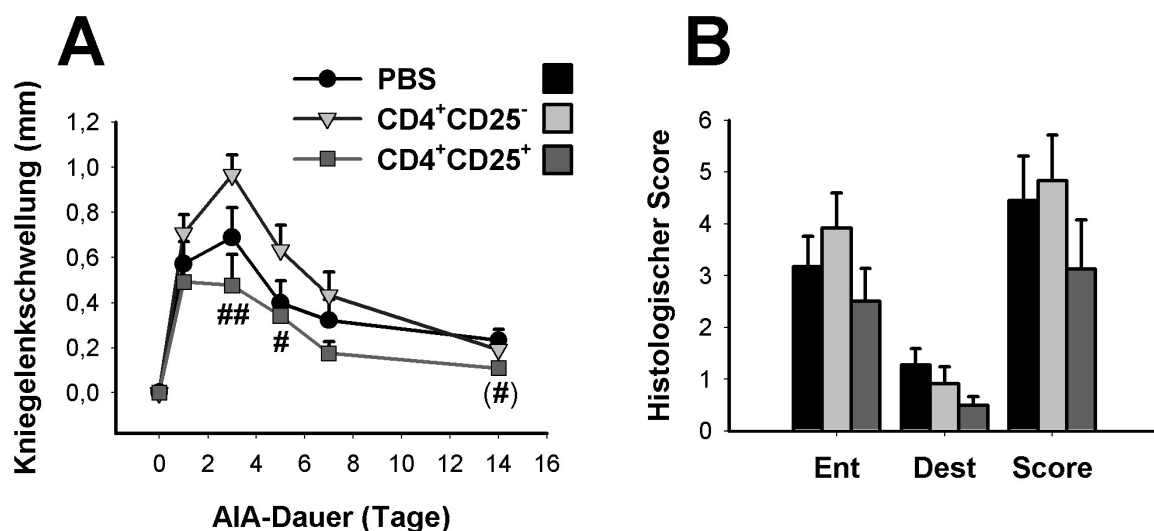


Abbildung 14: Transfer von 2×10^6 $CD4^+CD25^-$ oder $CD4^+CD25^+$ Zellen ($n=6$ in beiden Gruppen) (isoliert aus naiven Tieren) oder PBS ($n=9$) in mBSA/CFA-immunisierte Mäuse zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion (d 0) reduziert die klinische (Gelenkschwellung, A) und histologische (B) Schwere der AIA. (#) $p < 0,1$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ $CD4^+CD25^-$ vs. $CD4^+CD25^+$; Mann-Whitney U-Test)

4.2.2 Transfer von CD4⁺CD25⁺ Zellen aus immunisierten Tieren

Im Gegensatz zu ihrem *in vitro* Verhalten können CD4⁺CD25⁺ Zellen *in vivo* sowohl als Reaktion auf eine lymphopenische Umgebung als auch auf eine Verabreichung von Antigen in einer immunogenen Form (z.B. in CFA oder reifen DZ) gut proliferieren. Diese Stimulation kann ihren suppressiven Effekt sogar verstärken. Deshalb wurde als nächstes untersucht, ob CD4⁺CD25⁺ Zellen aus immunisierten Tieren eine möglicherweise verstärkte suppressive Wirkung in der AIA haben. Dazu wurden CD4⁺CD25⁺ Zellen aus Tieren isoliert, die 21 und 14 Tage zuvor mit mBSA/CFA immunisiert worden sind. Zunächst wurde überprüft, ob diese Zellen die typischen *in vitro* Eigenschaften von T_{reg}-Zellen besitzen. Dazu wurde ihre Proliferation nach Stimulation mit anti-CD3 sowie ihre Zytokinproduktion nach Stimulation mit Concanavalin A gemessen. Ebenso wie CD4⁺CD25⁺ Zellen aus naiven Tieren (Abb. 13) waren CD4⁺CD25⁺ Zellen aus immunisierten Tieren hypoproliferativ im Vergleich zu CD4⁺CD25⁻ Zellen.

Die CD4⁺CD25⁺ Zellen aus immunisierten Tieren konnten die Proliferation von CD4⁺CD25⁻ Zellen in der Kokultur verhindern (Abb. 15A). Dieser Effekt war partiell zellkontaktabhängig, da durch die physikalische Trennung der beiden Zellpopulationen durch den Einsatz von Transwell™-Einsätzen dieser Effekt teilweise aufgehoben werden konnte. Wiederum produzierten die CD4⁺CD25⁻ Zellen deutlich mehr Zytokine als CD4⁺CD25⁺ Zellen. Besonders auffällig ist, dass die T_{reg}-Zellen kein oder nur sehr wenig IL-2 produzierten (Abb. 15B). Insgesamt zeigten die T_{reg}-Zellen aus immunisierten Tieren eine stärkere Proliferation und Zytokinproduktion als Zellen aus naiven Tieren. Dies könnte darauf hinweisen, dass hier möglicherweise eine, allerdings geringe Kontamination mit aktivierten T-Zellen (durch die Immunisierung bedingt) vorliegt. Diese *in vitro* Untersuchungen zeigen allerdings auch, dass es sich bei CD4⁺CD25⁺ Zellen aus immunisierten Tieren um eine Zellpopulation mit den typischen Eigenschaften von T_{reg}-Zellen handelt: fehlende Proliferation und IL-2-Produktion, Hemmung der Proliferation von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen.

Der Transfer von CD4⁺CD25⁺ Zellen aus immunisierten Mäusen in AIA-Tiere zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion führte zu einer deutlichen Reduktion der klinischen Arthritisschwere, die in der akuten Phase begann und bis zum Ende des Experimentes andauerte (Abb. 16A). Der Transfer von CD4⁺CD25⁻ Zellen hingegen

fürte nicht zu einer deutlichen Beeinflussung der AIA. Die histologische Untersuchung konnte diese Befunde eindeutig bestätigen: der Transfer von $CD4^+CD25^+$ Zellen konnte die Schwere der AIA deutlich verringern, während $CD4^+CD25^-$ Zellen keinen Effekt hatten (Abb. 16B). Diese Daten zeigen, dass $CD4^+CD25^+$ Zellen aus mBSA/CFA-immunisierten Tieren voll funktionelle T_{reg} -Zellen sind.

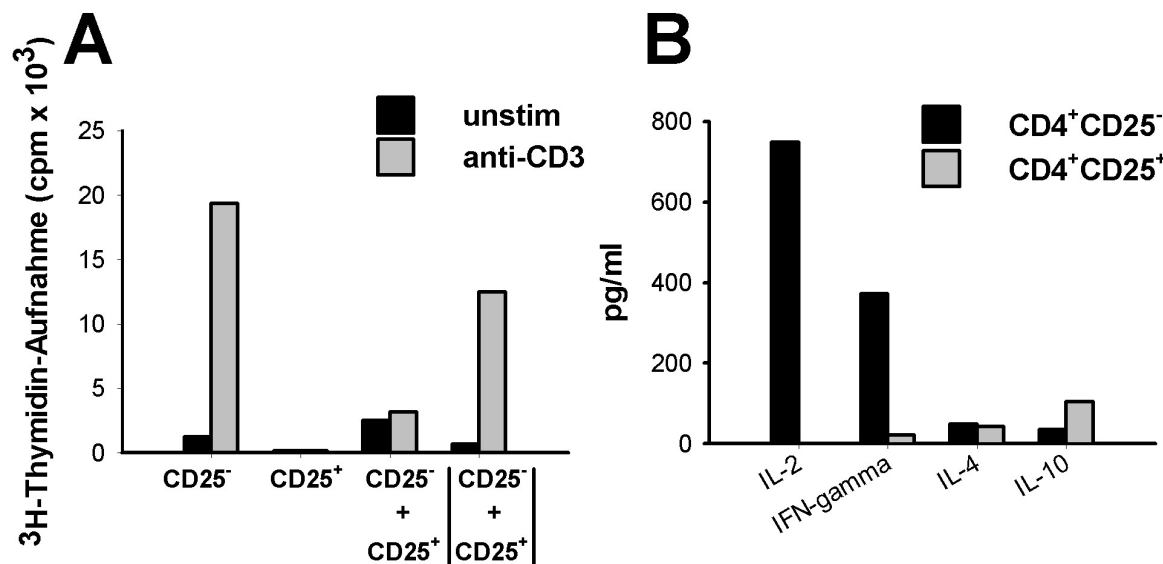



Abbildung 15: Charakterisierung von $CD4^+CD25^-$ und $CD4^+CD25^+$ Zellen aus mBSA/CFA-immunisierten Tieren *in vitro*. A: 2×10^5 $CD4^+CD25^-$ ($CD25^-$) oder $CD4^+CD25^+$ ($CD25^+$) Zellen oder 2×10^5 $CD4^+CD25^-$ Zellen zusammen mit 1×10^5 $CD4^+CD25^+$ Zellen ($CD25^- + CD25^+$) pro Well einer 96-Well-Platte wurden für 72 h ohne (unstim) oder in Gegenwart von anti-CD3 (1 μ g/ml, platebound) kultiviert und die Proliferation über den Einbau von 3 H-Thymidin bestimmt. Genau wie Zellen aus naiven Tieren proliferieren $CD4^+CD25^+$ Zellen nur sehr wenig und hemmen in Kokultur die Proliferation der $CD4^+CD25^-$ Zellen. Dieser Effekt kann durch die Verhinderung direkten Zellkontaktes durch Trennung der Zellen mittels Transwell™-Einsätzen () teilweise rückgängig gemacht werden. B: $CD4^+CD25^-$ oder $CD4^+CD25^+$ Zellen wurden für 24 Stunden mit Medium (unstim) oder Concanavalin A (ConA; 5 μ g/ml) stimuliert und anschließend der Gehalt an Zytokinen im Kulturüberstand gemessen. Die Daten aus einem repräsentativen von drei durchgeführten Experimenten sind gezeigt.

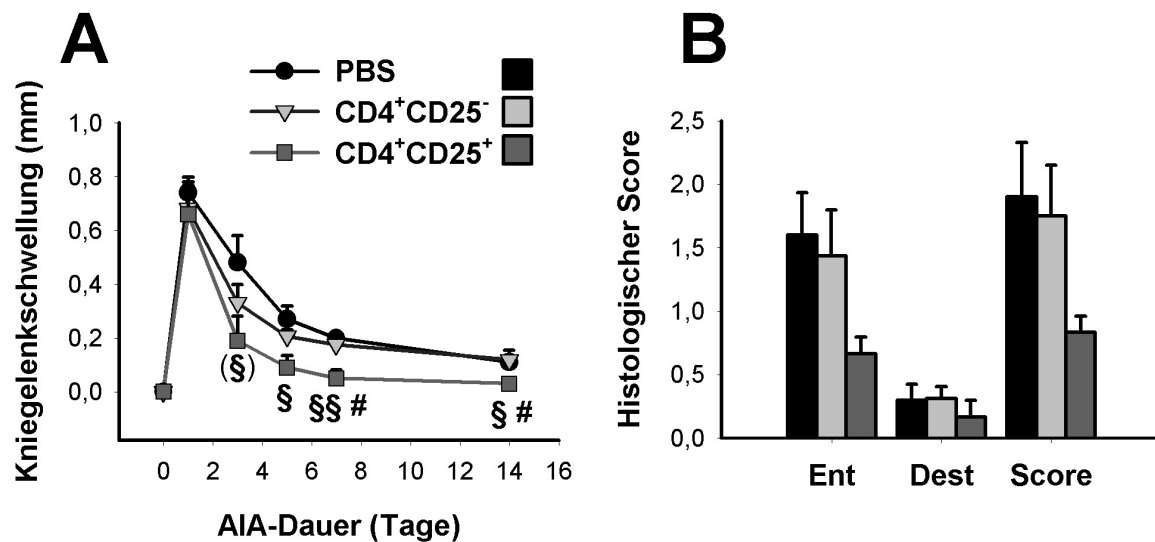


Abbildung 16: Der Transfer von 2×10^6 CD4⁺CD25⁺ Zellen aus mBSA/CFA-immunisierten Mäusen in mBSA/CFA-immunisierte Tiere ($n=5$) zum Zeitpunkt der AIA-Induktion verringert die klinische (A) und histologische (B) Arthritis-Schwere, während PBS ($n=5$) oder CD4⁺CD25⁻ Zellen ($n=8$) keinen Effekt haben. (§) $p < 0,1$; § §) $p < 0,05$; § § §) $p < 0,01$ für CD4⁺CD25⁺ vs. PBS; # $p < 0,05$ für CD4⁺CD25⁺ vs. CD4⁺CD25⁻; Mann-Whitney U-Test)

4.2.3 Transfer von präaktivierten CD4⁺CD25⁺ Zellen

In weiteren Experimenten wurde versucht, die suppressive Wirkung von CD4⁺CD25⁺ Zellen durch eine Stimulation mit immobilisiertem anti-CD3 (Klon 145 2C11, 3 µg/ml) und löslichem anti-CD28 (Klon 37.51, 10 µg/ml) in der Gegenwart von rekombinanten humanen IL-2 (Proleukin, 100 U/ml) für 72 Stunden zu steigern und diese Zellen gegebenenfalls zu expandieren. Eine Expansion der CD4⁺CD25⁺ Zellen konnte jedoch in keinem der durchgeführten Experimente erreicht werden, im Gegensatz zu den CD4⁺CD25⁻ Zellen, die durch diese Vorbehandlung massiv proliferierten.

Der adoptive Transfer dieser so präaktivierten Zellen führte zu einer eindrucksvollen Hemmung der Arthritis. Durch den Transfer von 1×10^6 CD4⁺CD25⁺, nicht aber von CD4⁺CD25⁻ Zellen, konnte die Gelenkschwellung in der akuten als auch in der chronischen Phase deutlich und signifikant gehemmt werden (Abb. 17A). Die histologische Untersuchung dieser Gelenke zeigte eine starke Reduktion der histopathologischen Veränderungen in den Rezipienten von CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen (Abb. 17B-E).

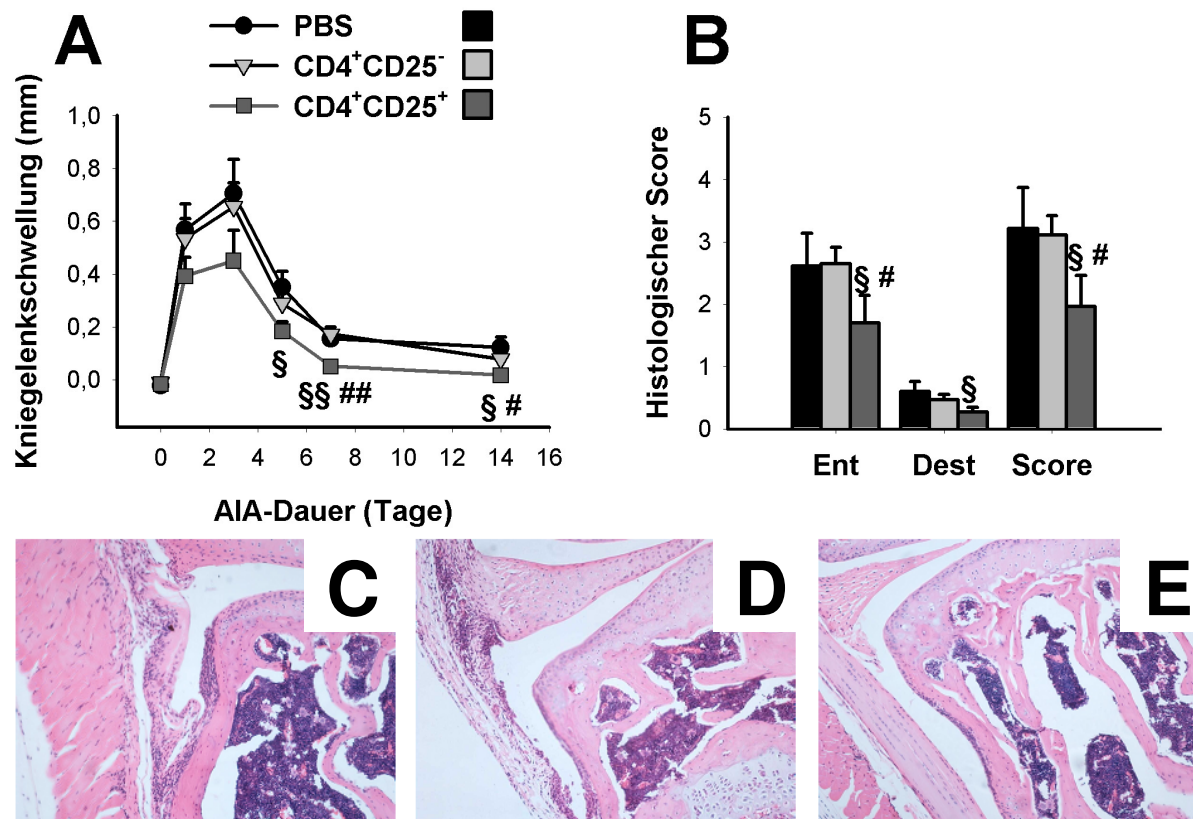


Abbildung 17: Der Transfer von 1×10^6 *in vitro* präaktivierten CD4⁺CD25⁺ Zellen aus normalen Tieren in mBSA/CFA-immunisierte Mäuse zum Zeitpunkt der AIA-Induktion (d 0) hemmt signifikant die klinische (A) und histologische (B) Arthritisschwere ($n=6$). PBS ($n=9$) oder CD4⁺CD25⁻ Zellen ($n=9$) haben keinen Effekt. (§ $p < 0,05$; §§ $p < 0,01$ für CD4⁺CD25⁺ vs. PBS; # $p < 0,05$ für CD4⁺CD25⁺ vs. CD4⁺CD25⁻; Mann-Whitney *U*-Test). Repräsentative mikrophotografische Aufnahme von Rezipienten von PBS (C), CD4⁺CD25⁻ Zellen (D) oder CD4⁺CD25⁺ Zellen (E).

Auch durch den Transfer von deutlich weniger CD4⁺CD25⁺ Zellen konnte noch eine eindrucksvolle Beeinflussung der Arthritis erreicht werden. So waren zum Beispiel $0,5 \times 10^6$ oder $0,2 \times 10^6$ Zellen ausreichend, die klinische und histologische AIA-Schwere zu verringern (Abb. 18 und 19).

In keinem der durchgeführten Experimente konnte eine nennenswerte Verringerung der Arthritis durch den Transfer von CD4⁺CD25⁻ Zellen erreicht werden, auch nicht durch den Transfer sehr vieler (5×10^6) Zellen (Abb. 18).

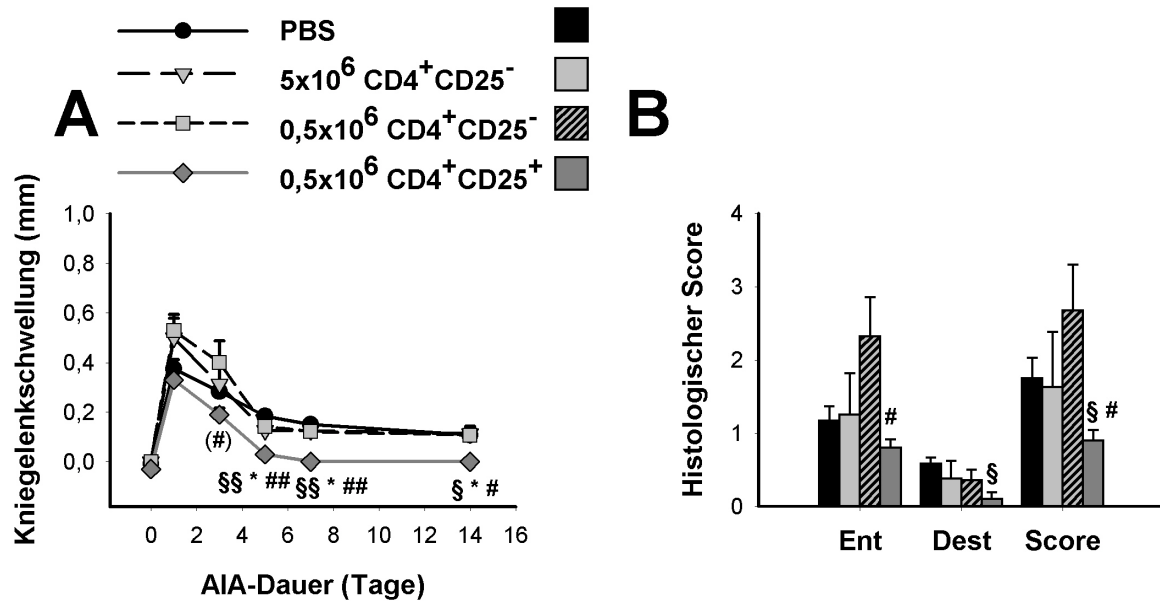


Abbildung 18: Der Transfer von $0,5 \times 10^6$ *in vitro* präaktivierten $CD4^+CD25^+$ Zellen aus normalen Tieren in mBSA/CFA-immunisierte Mäuse zum Zeitpunkt der AIA-Induktion (d 0) hemmt die klinische (A) und histologische (B) Arthritisschwere. $0,5 \times 10^6$ oder sogar die 10fache Menge (5×10^6) $CD4^+CD25^-$ Zellen oder PBS haben keinen Effekt (PBS $n=6$, $CD4^+CD25^-$ 5×10^6 $n=4$, $CD4^+CD25^-$ $0,5 \times 10^6$ $n=7$, $CD4^+CD25^+$ $0,5 \times 10^6$ $n=5$). (§ $p < 0,05$; §§ $p < 0,01$ für $CD4^+CD25^+$ vs. PBS; * $p < 0,05$ für $CD4^+CD25^+$ vs. 5×10^6 $CD4^+CD25^-$; (#) $p < 0,1$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ für $CD4^+CD25^+$ vs. $0,5 \times 10^6$ $CD4^+CD25^-$; Mann-Whitney U-Test)

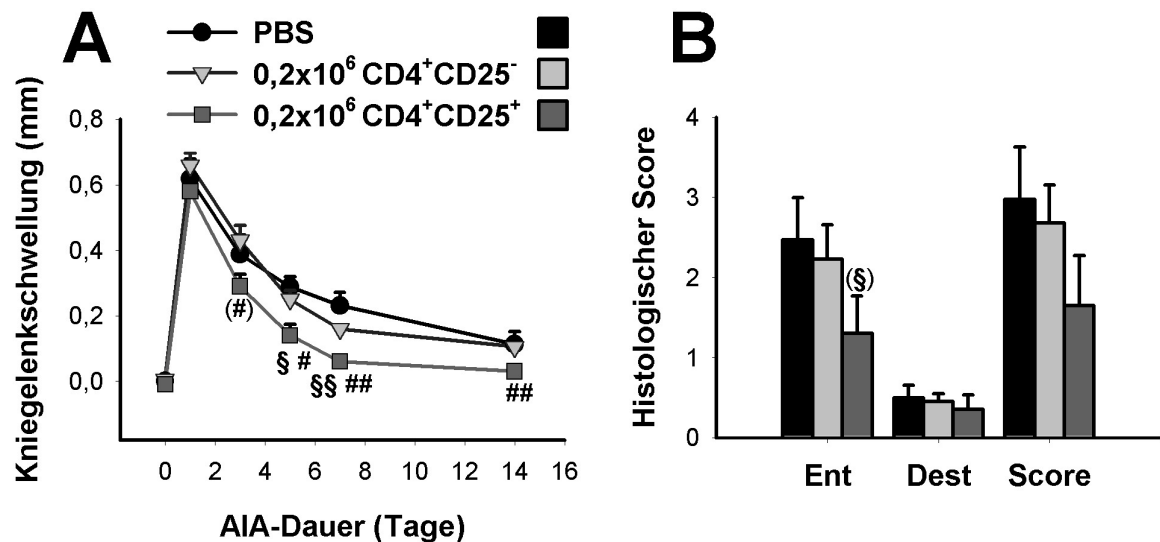


Abbildung 19: Auch der Transfer von $0,2 \times 10^6$ *in vitro* präaktivierten $CD4^+CD25^+$ Zellen aus normalen Tieren in mBSA/CFA-immunisierte Mäuse zum Zeitpunkt der AIA-Induktion (d 0) hemmt die klinische (A) und histologische (B) Arthritisschwere. $0,2 \times 10^6$ $CD4^+CD25^-$ Zellen oder PBS haben keinen Effekt (PBS $n=8$, $CD4^+CD25^-$ $n=10$, $CD4^+CD25^+$ $n=5$). (§ $p < 0,05$; §§ $p < 0,01$ für $CD4^+CD25^+$ vs. PBS; (#) $p < 0,1$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ für $CD4^+CD25^+$ vs. $CD4^+CD25^-$, Mann-Whitney U-Test)

In weiteren Experimenten wurde die Fähigkeit der $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen getestet, eine bereits etablierte Arthritis zu beeinflussen. Dazu wurden 1×10^6 Zellen am Tag 1 der AIA, also 24 Stunden nach der intraartikulären Antigeninjektion transferiert. Überraschenderweise zeigte sich, dass sich die Arthritis zu diesem Zeitpunkt weder in ihrem klinischem Verlauf noch in ihrer histologischen Schwere beeinflussen ließ (Abb. 20).

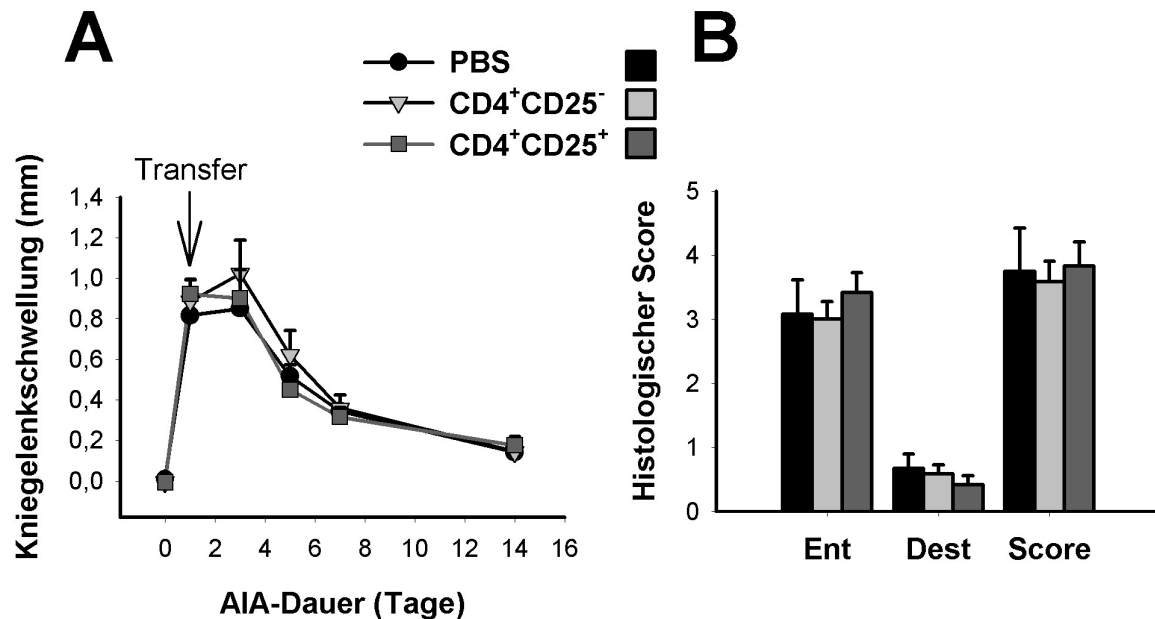


Abbildung 20: Der Transfer von 1×10^6 *in vitro* präaktivierten $CD4^+CD25^+$ oder $CD4^+CD25^-$ Zellen oder PBS am Tag 1 (Pfeil) der AIA hat keinen Einfluss auf die klinische (A) oder histologische (B) Arthritisschwere. (PBS $n=9$; $CD4^+CD25^-$ $n=9$; $CD4^+CD25^+$ $n=6$)

Weiterhin wurde versucht, durch den Transfer von T_{reg} -Zellen die chronische Phase der AIA zu beeinflussen. Dazu wurden $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen am Tag 7 der Arthritis in die Rezipienten transferiert. Wiederum ließ sich kein Effekt dieses Zelltransfers nachweisen (Abb. 21).

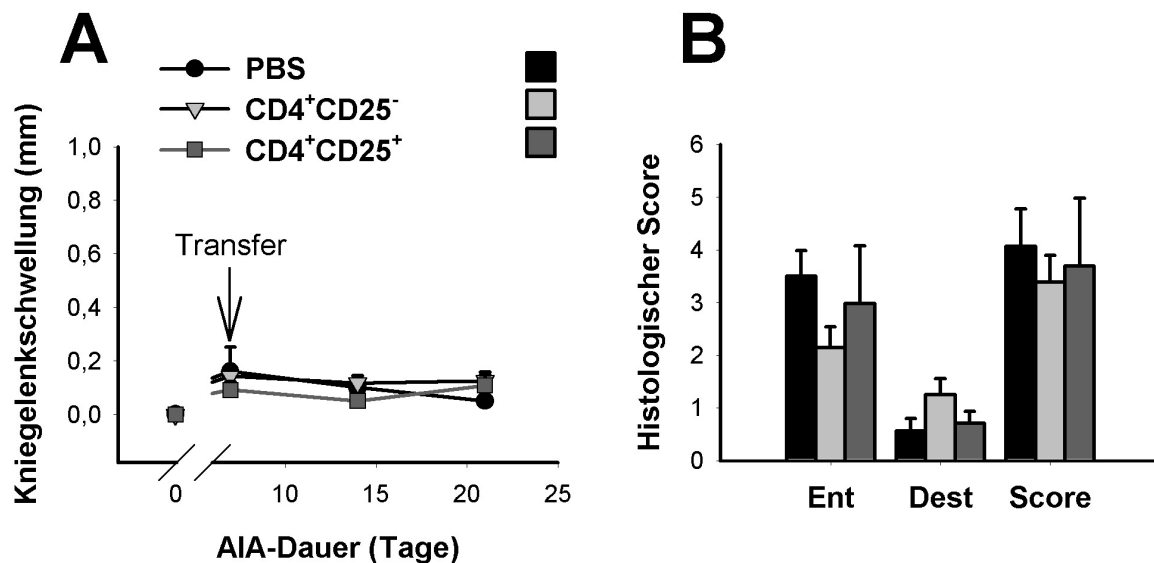


Abbildung 21: Der Transfer von 1×10^6 *in vitro* präaktivierten CD4⁺CD25⁺ oder CD4⁺CD25⁻ Zellen oder PBS am Tag 7 (Pfeil) der AIA hat keinen Einfluss auf die klinische (A) oder histologische (B) Arthritis schwere. (PBS $n=5$; CD4⁺CD25⁻ $n=6$; CD4⁺CD25⁺ $n=6$)

4.2.4 Zusammenfassung

Die hier dargestellten Daten zeigen, dass der Transfer von CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen in mBSA/CFA-immunisierte Tiere zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion den Krankheitsverlauf signifikant beeinflussen kann. Dies ist als weiterer Beleg für eine wichtige Rolle der T_{reg}-Zellen in der Pathogenese der chronischen Arthritis zu werten. Ziel dieser Untersuchungen war es nicht, die Effektivität von T_{reg}-Zellen verschiedener Herkunft (naives vs. immunisiertes Tier, Einfluss der Präaktivierung) zu testen, aus den Daten lässt sich aber folgern, dass die *in vitro* präaktivierten Zellen deutlich potentere Suppressoren der AIA sind.

Trotz der deutlichen Beeinflussung der AIA durch den Transfer von T_{reg}-Zellen zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion ließ sich kein Effekt auf eine bereits etablierte Arthritis zeigen.

4.2.5 Beeinflussung der zellulären und humoralen Immunreaktivität

4.2.5.1 DTH

Der eindrucksvolle klinische Effekt des Zelltransfers auf die Schwere der AIA machte eine detaillierte Analyse des Immunsystems der Rezipienten notwendig, um Aufschluss über die eventuell daran beteiligten Mechanismen zu erhalten. So wurde die zelluläre Immunantwort *in vivo* durch die DTH-Reaktion untersucht, die am Tag 7 der AIA durch eine intrakutane Antigeninjektion induziert wurde. In keinem der

Experimente wurde die DTH-Reaktion durch den Transfer von CD4⁺CD25⁺ Zellen signifikant gehemmt (Abb. 22A).

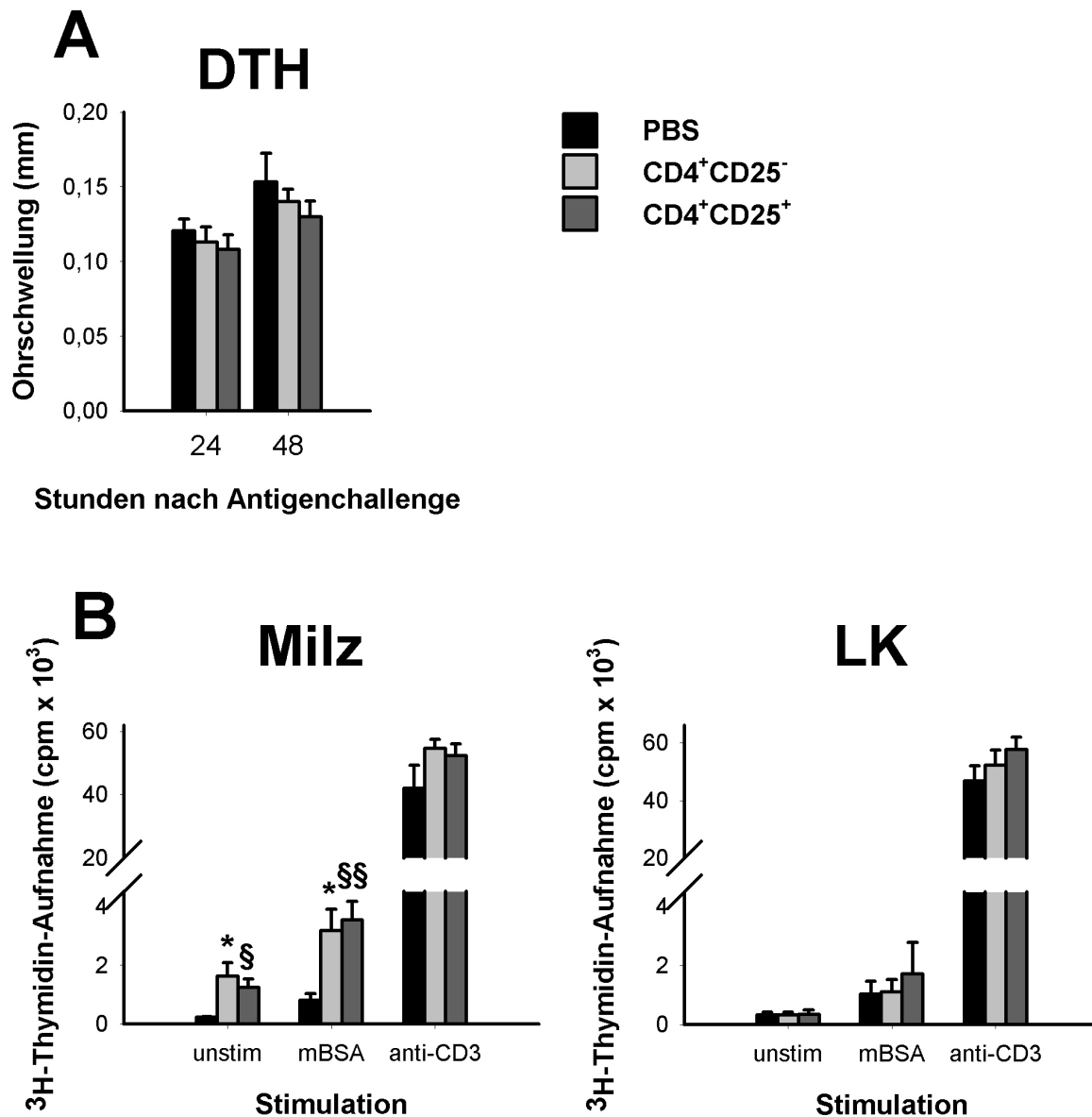


Abbildung 22: Zelluläre Immunreaktivität gemessen als verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion (DTH) *in vivo* (A) und als Proliferation von *in vitro* restimulierten Milz- und Lymphknotenzellen (B). Die Zellen wurden am Tag 14 der AIA aus den Rezipienten von 1×10^6 *in vitro* präaktivierten CD4⁺CD25⁻ oder CD4⁺CD25⁺ Zellen bzw. PBS gewonnen (Transfer am d 0) und mit Medium (unstim), 25 µg/ml mBSA oder 1 µg/ml anti-CD3 (platebound) stimuliert. Gezeigt sind die Daten eines von zwei unabhängigen Experimenten, PBS und CD4⁺CD25⁻ $n=9$, CD4⁺CD25⁺ $n=6$). (* $p < 0,05$ für CD4⁺CD25⁻ vs. PBS; § $p < 0,05$; §§ $p < 0,01$ für CD4⁺CD25⁺ vs. PBS; Student's *t*-Test)

4.2.5.2 Proliferation und Zytokinproduktion

Zur weiteren Beurteilung der mBSA-spezifischen Immunantwort wurden die Proliferation und die Zytokinproduktion von Milz- und Lymphknotenzellen gemessen. (Abb. 22B). Überraschenderweise proliferierten die Milzzellen der Tiere, die

CD4⁺CD25⁻ beziehungsweise CD4⁺CD25⁺ Zellen erhalten hatten, deutlich stärker als die Milzzellen der PBS-Rezipienten. In den drainierenden Lymphknoten fand sich dagegen kein signifikanter Unterschied (Abb. 22B). Auch die Zytokinproduktion der Milzzellen war sowohl in den CD4⁺CD25⁻ als auch in den CD4⁺CD25⁺ T-Zell-Rezipienten teilweise sehr signifikant erhöht, während diese Erhöhung in den drainierenden Lymphknoten deutlich geringer oder gar nicht nachzuweisen war (Abb. 23).

Dieser unerwartete Befund lässt sich am ehesten dahingehend interpretieren, dass in den Milzen ein Teil der transferierten Zellen aufgefangen und abgebaut wird, was wiederum zu einer unspezifischen Stimulation der T-Zellen in diesem Organ führt. Keinesfalls lässt sich der antiarthritische Effekt der T_{reg}-Zellen somit auf eine Hemmung der mBSA-spezifischen Immunantwort zurückführen.

Die Messung des Zytokingehaltes von Kulturüberständen von Milz- und Lymphknotenzellen mittels ELISA ergab ähnliche Resultate (Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob durch den Transfer von CD4⁺CD25⁺ Zellen die Anzahl der IL-10-produzierenden CD4⁺ T-Zellen in den Rezipienten erhöht wird (Dieckmann et al. 2002, Jonuleit et al. 2002), wurde die Frequenz der mBSA-spezifischen IL-10-produzierenden CD4⁺ T-Zellen mittels Zytokin-Sekretionsassay direkt gemessen. Dieser Zytokin-Sekretionsassay erlaubt die extrem sensitive Detektion antigenspezifischer zytokinsezernierender Zellen.

In den Milzen und Lymphknoten von Tieren, die PBS oder CD4⁺CD25⁻ Zellen erhalten hatten, produzierten ca. 1,5-2,7% der CD4⁺ T-Zellen IL-10. Diese Zahl erhöhte sich auch nach Stimulation der Zellen mit mBSA *in vitro* nicht, was darauf hinweist, dass es in diesen Tieren keine detektierbaren mBSA-spezifischen IL-10⁺CD4⁺ Zellen gibt. In den Rezipienten von CD4⁺CD25⁺ Zellen jedoch kam es nach Stimulation der Zellen mit mBSA zu einer Erhöhung der Anzahl der IL-10⁺CD4⁺ Zellen (Abb. 24). Allerdings muss bei der Interpretation dieser Ergebnisse in Betracht gezogen werden, dass es in den Rezipienten von CD4⁺CD25⁺ Zellen zu einer nicht unerheblichen unspezifischen Stimulation der Milz- und Lymphknotenzellen kommt (Abb. 23). Es ist daher schwierig, eine Aussage darüber zu treffen, ob die erhöhte Anzahl von IL-10⁺CD4⁺ Zellen eine Folge einer Induktion von IL-10 durch T_{reg}-Zellen in anderen T-Zellen (infektiöse Toleranz), einer Sekretion von IL-10 durch die adoptiv transferierten T_{reg}-Zellen selbst oder ein unspezifischer Effekt ist. Dieser

Fragestellung sollte durch Transferexperimente mit IL-10-defizienten T_{reg}-Zellen oder dem Transfer von Wildtyp-T_{reg}-Zellen in IL-10-defiziente Rezipienten weiter untersucht werden.

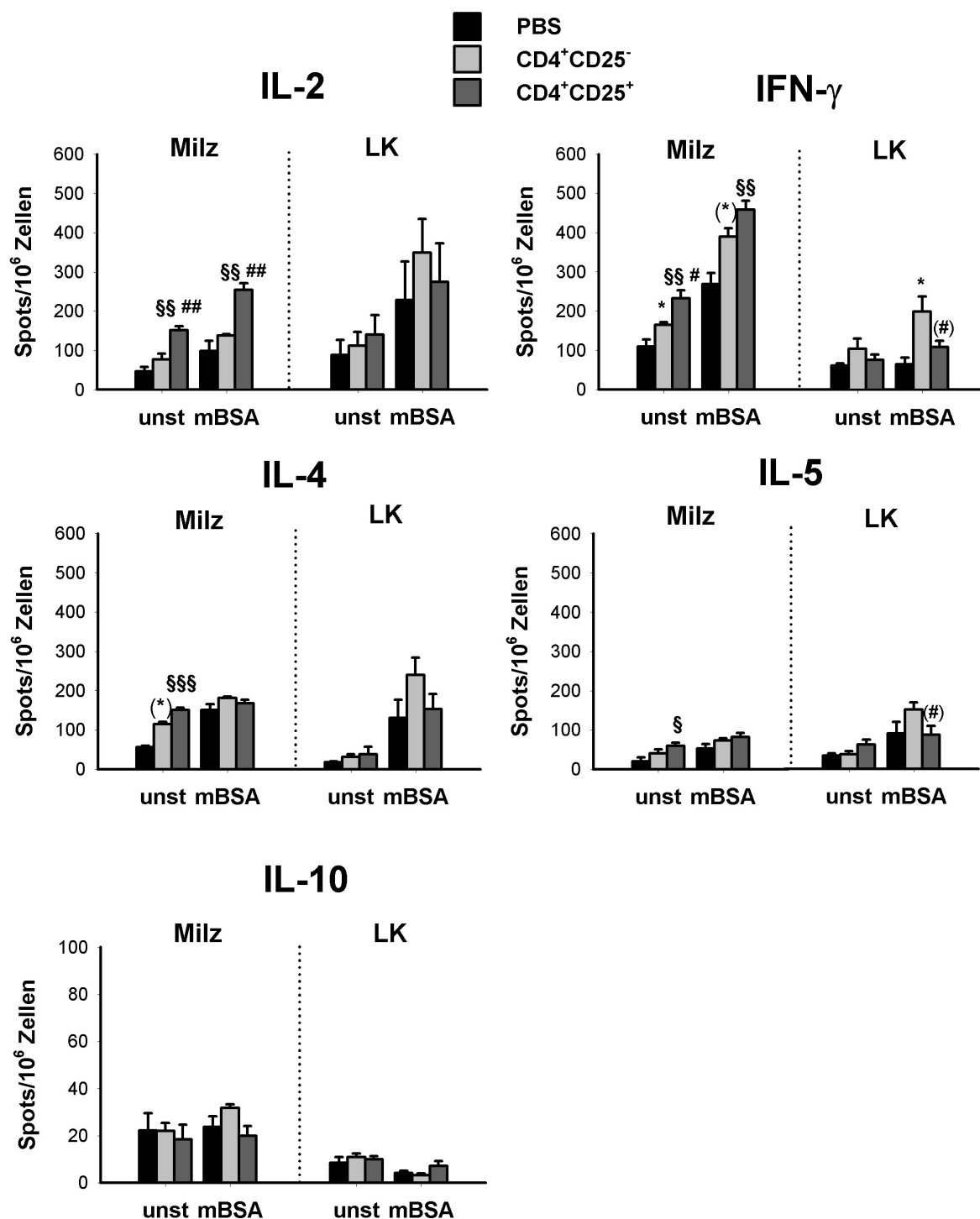


Abbildung 23: Zytokinproduktion von Milz- und Lymphknotenzellen (LK) aus arthritischen Tieren (d 14), die PBS ($n=4$), $0,5 \times 10^6$ CD4⁺CD25⁻ ($n=4$) bzw. CD4⁺CD25⁺ Zellen zum Zeitpunkt der AIA-Induktion erhalten hatten. (*) $p < 0,1$; * $p < 0,05$ für CD4⁺CD25⁻ vs. PBS; § $p < 0,05$; §§ $p < 0,01$; §§§ $p < 0,001$ für CD4⁺CD25⁺ vs. PBS; (#) $p < 0,1$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ für CD4⁺CD25⁺ vs. CD4⁺CD25⁻; Student's *t*-Test)

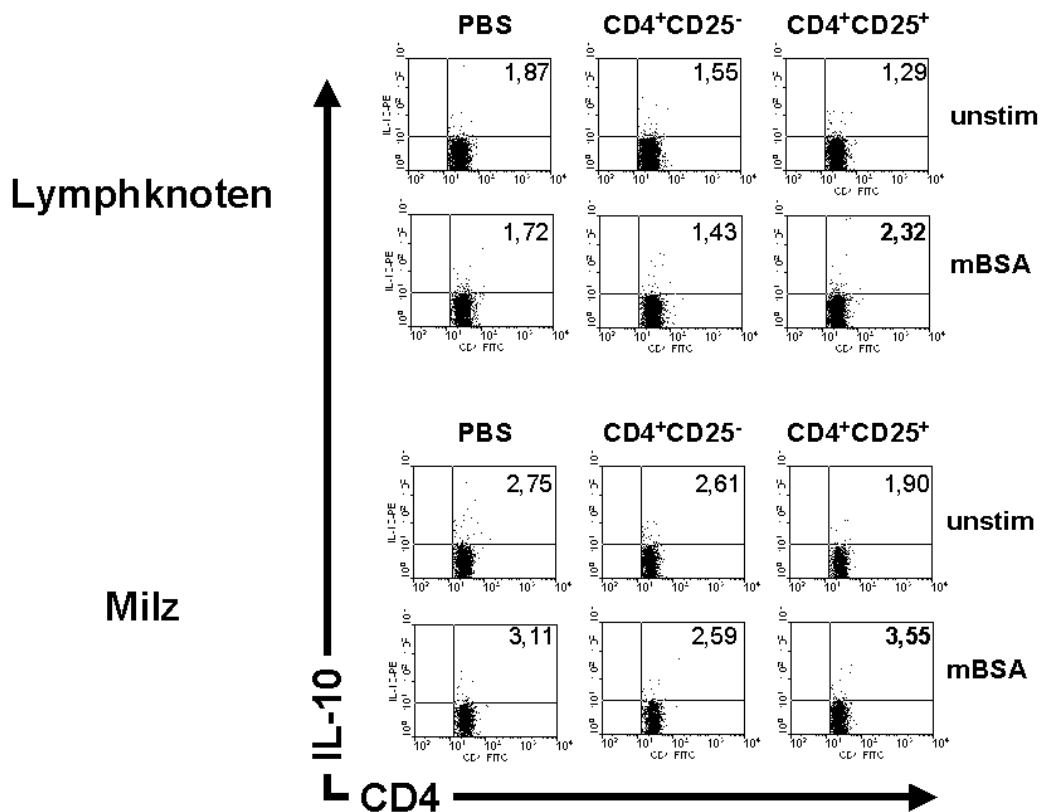


Abbildung 24: Messung der Anzahl der mBSA-spezifischen IL-10-produzierenden CD4⁺ Zellen in Milzen und Lymphknoten in arthritischen Rezipienten (d14) von PBS oder 1×10^6 CD4⁺CD25⁻ oder CD4⁺CD25⁺ Zellen mittels Zytokin-Sekretionsassays. Gepoolte Milz- und Lymphknotenzellen wurden für 18 Stunden in Medium allein (unstim) oder in Gegenwart von 25 µg/ml mBSA für 16 Stunden kultiviert und anschließend der IL-10-Sekretionsassay wie unter 3.9 beschrieben durchgeführt. Hier dargestellt sind CD4⁺ Zellen nach Ausschluss der toten Zellen mittels Propidiumjodid-Exklusion. Die Zahlen geben den Anteil der IL-10⁺ Zellen an den Propidiumjodid-negativen CD4⁺ Zellen an.

4.2.5.3 Immunglobuline

Die Bestimmung der Immunglobuline gegen mBSA, Kollagen Typ I und II sowie Proteoglykane im Serum zeigte nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. In dem hier gezeigten Experiment kam es in den Rezipienten der CD4⁺CD25⁺ Zellen zu einer, gegenüber der PBS-Gruppe beziehungsweise CD4⁺CD25⁻ Gruppe, statistisch signifikanten Verringerung des mBSA- und Kollagen-Typ-I-spezifischen IgG (Abb. 25). Der Transfer von CD4⁺CD25⁻ Zellen dagegen führte zu einer Erhöhung aller IgG.

In anderen Experimenten, in denen deutlich weniger T_{reg}-Zellen transferiert wurden, wurde eine geringe numerische Verringerung des mBSA-spezifischen IgG gemessen, während alle anderen IgG unbeeinflusst blieben (Daten nicht gezeigt). Somit lässt sich eine geringe Beeinflussung der B-Zell-Antwort durch T_{reg}-Transfer

demonstrieren, der möglicherweise auf einer direkten Hemmung der B-Zellen durch T_{reg} -Zellen beruhen könnte (Nakamura et al. 2001, Bystry et al. 2001).

Die Messung der IgG-Subklassen als Parameter des T_h1/T_h2 -Gleichgewichtes zeigten keine signifikanten Veränderungen (Daten nicht gezeigt).

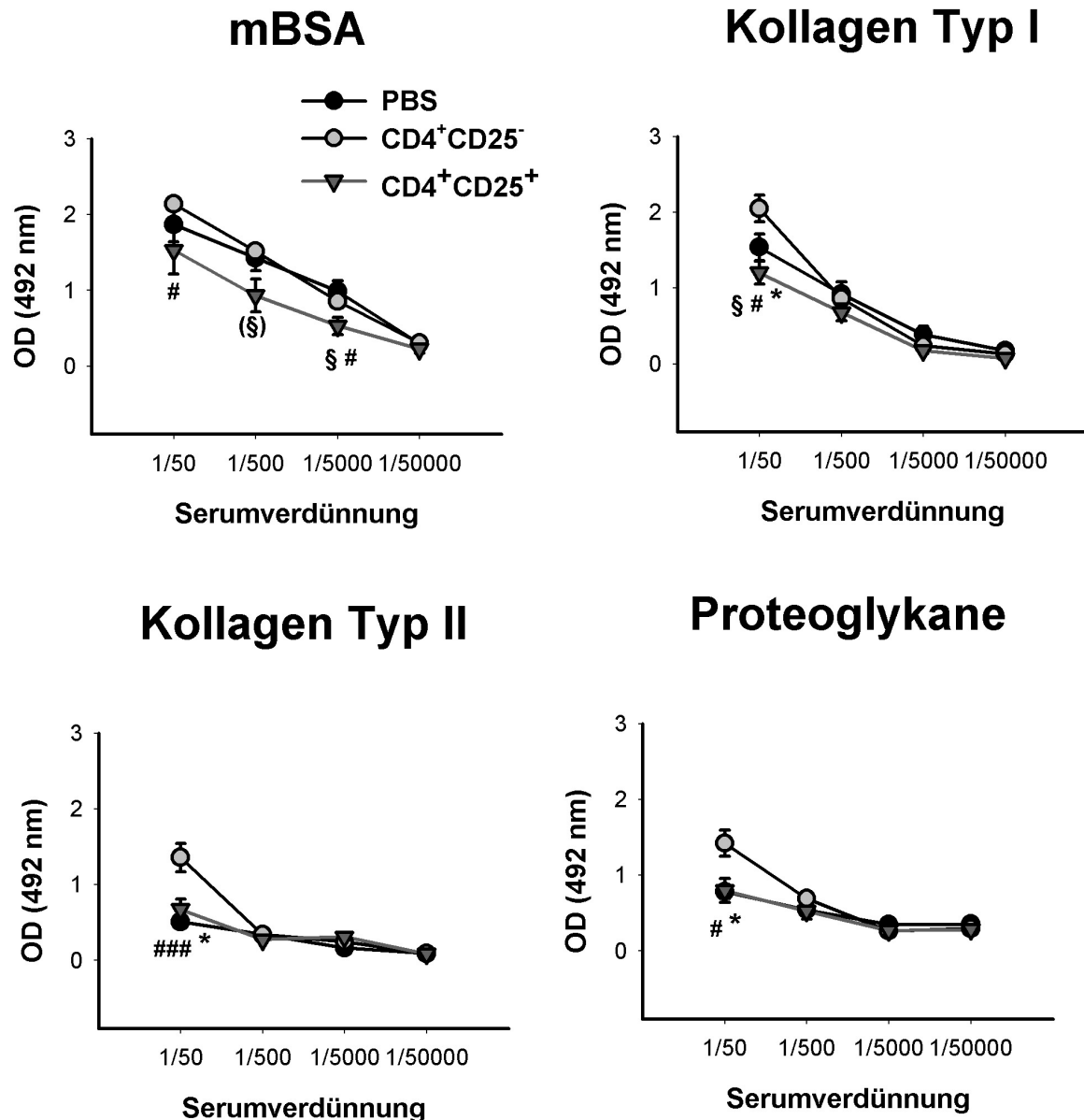


Abbildung 25: IgG gegen mBSA, Kollagen Typ I, Kollagen Typ II und Proteoglykane im Serum arthritischer Tiere (d14), die PBS oder 1×10^6 CD4⁺CD25⁻ bzw. CD4⁺CD25⁺ Zellen erhalten hatten. (* $p < 0,05$ für CD4⁺CD25⁻ vs. PBS; (§) $p < 0,1$; §# $p < 0,05$ für CD4⁺CD25⁺ vs. PBS; # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ für PBS vs. CD4⁺CD25⁻; Students *t*-Test)

4.2.6 Untersuchungen zum Migrationsverhalten von CD4⁺CD25⁺ Zellen

Um das Homingverhalten der CD4⁺CD25⁺ beziehungsweise CD4⁺CD25⁻ Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurden diese Zellen radioaktiv markiert und am Tag 7 der AIA in die Rezipienten transferiert. Für diese Experimente kam ein abgewandeltes

Zellisoliationsverfahren zum Einsatz, um eine Beeinflussung des Homingverhaltens durch Magnetbeads oder Antikörper an den transferierten Zellen zu vermeiden. Zunächst wurden $CD4^+$ Zellen aus Milzen und Lymphknoten von naiven Tieren mittels Panning negativ angereichert (d.h. alle $CD4^-$ Zellen entfernt). Diese Zellen wurden anschließend unter Verwendung von fluorochromgekoppelten Antikörperfragmenten (F(ab) oder Antikörpern, die nicht mit dem Migrationsverhalten der Zellen *in vivo* interferieren, durchflusszytometrisch in $CD4^+CD25^+$ und $CD4^+CD25^-$ Zellen sortiert. Diese Zellen wurden mit 111 Indium markiert und 1×10^6 Zellen i.v. transferiert. Die Rezipienten wurden nach 24 Stunden getötet und die Verteilung der Radioaktivität in den einzelnen Organen gemessen.

Die Untersuchungen zeigten, dass sich $CD4^+CD25^-$ Zellen, verglichen mit $CD4^+CD25^+$ Zellen, besser in den sekundären Lymphorganen wie Lymphknoten und Milz anreicherten. Im Gegensatz dazu wanderten deutlich mehr $CD4^+CD25^+$ Zellen in die Lebern und in die arthritischen Kniegelenken ein (Abb. 26A). Das Migrationsverhalten der T_{reg} -Zellen mit bevorzugter Anreicherung in der Leber und in entzündeten Geweben entspricht ihrem aktivierten/Effektor-Phänotyp ($CD45RB^{low}$, partiell $CD62L^{low}$), während der naive Phänotyp der $CD4^+CD25^-$ Zellen mit ihrer Rezirkulation in den sekundären lymphoiden Organen korrespondiert.

Um die Frequenz der transferierten Zellen in den sekundären Lymphorganen direkt zu untersuchen, wurden auch ein Teil der Zellen mit CFSE markiert und transferiert. Die Anzahl der CFSE-positiven Zellen wurde anschließend in Einzelzellsuspensionen aus Milzen und Lymphknoten mittels FACS[®] gemessen. Mit diesem Experiment konnten die Ergebnisse der Untersuchungen mit den 111 Indium-gelabelten Zellen voll bestätigt werden. Insbesondere konnte durch das Ausschließen toter Zellen aus der Analyse mittels Propidiumjodid gezeigt werden, dass sich tatsächlich lebende adoptiv transferierte Zellen in den Lymphorganen der Rezipienten befinden und deren Anteil an der $CD4^+$ Gesamtpopulation der Rezipienten gemessen werden. Die Frequenz der transferierten Zellen war sehr gering (0,14-0,4% der Gesamt- $CD4^+$ Zellen), dies stimmt aber mit Angaben aus der Literatur überein (Abb. 26B) (Fisson et al. 2003).

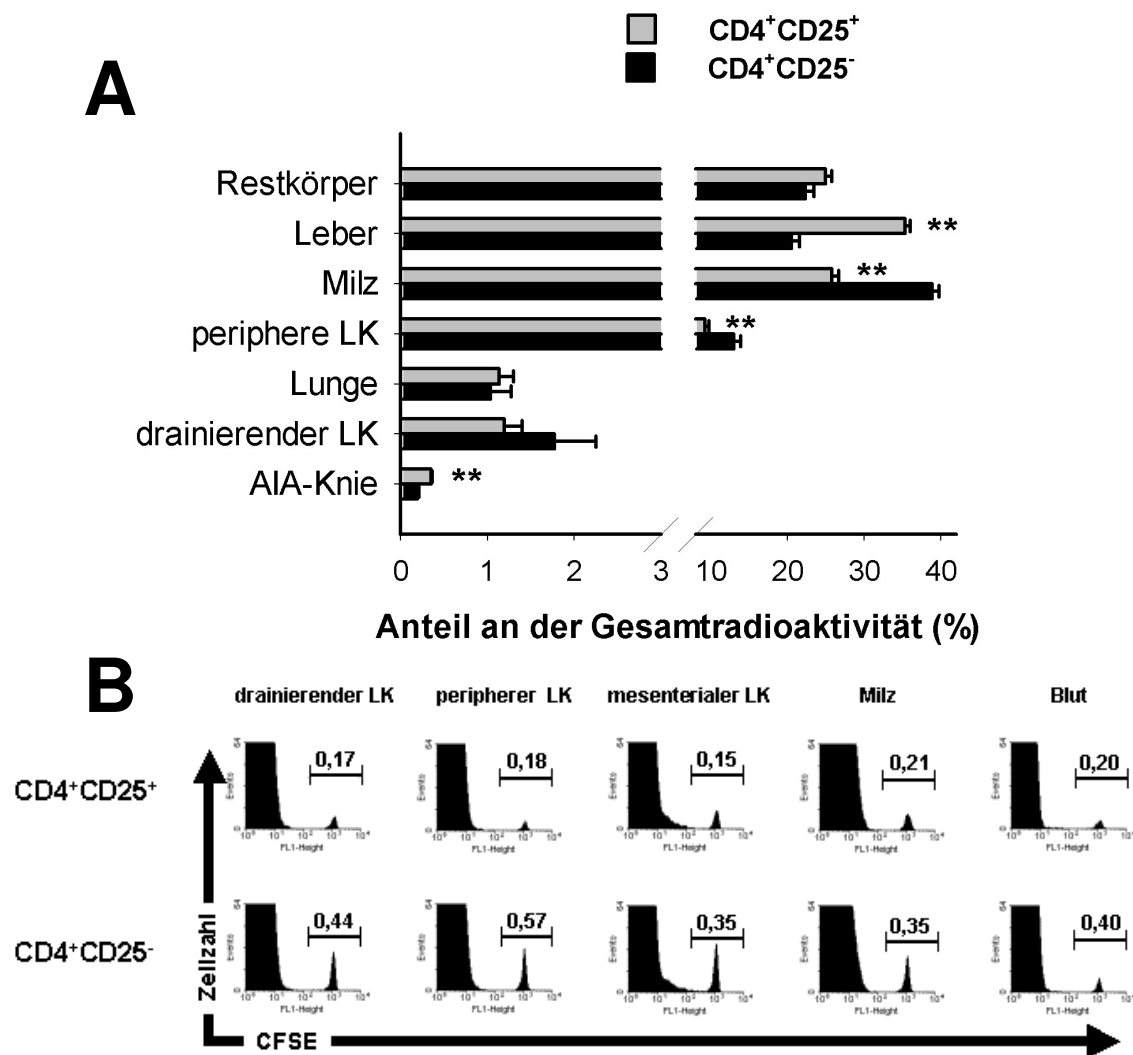


Abbildung 26: Migrationsverhalten von CD4⁺CD25⁺ Zellen *in vivo*. A: CD4⁺CD25⁻ bzw. CD4⁺CD25⁺ Zellen wurden nach der Isolation mit ¹¹¹Indium gelabelt und 1x10⁶ Zellen i.v. in arthritische Tiere (d7) transferiert. Nach 24 Stunden wurde die Organverteilung der Radioaktivität in den Rezipienten gemessen (6 Tiere/Gruppe, eins von zwei Experimenten ist gezeigt; ** $p < 0,01$; Mann-Whitney *U*-Test). B: CD4⁺CD25⁻ bzw. CD4⁺CD25⁺ Zellen wurden nach der Isolation mit CFSE gelabelt und 1x10⁶ Zellen i.v. in arthritische Mäuse injiziert. Nach 24 Stunden wurde der Anteil der CFSE-positiven an den Gesamt-CD4⁺ T-Zellen mittels FACS[®] gemessen.

Es wurde ebenfalls versucht, die CFSE-markierten Zellen direkt in Gefrierschnitten arthritischer Gelenke zu lokalisieren. Es konnten vereinzelte CFSE-positive Zellen nachgewiesen werden, allerdings war ihre Anzahl so gering, dass kein spezielles Muster der Infiltration (z.B. Cluster aus APZ und T_{reg}-Zellen) nachgewiesen werden konnte (Mottet et al. 2003).

4.2.7 Zusammenfassung

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich der antiarthritische Effekt des Transfers von T_{reg}-Zellen nicht durch eine systemische Suppression der zellulären Immunreaktivität gegen mBSA *in vivo* erklären lässt. In den *ex vivo* untersuchten

Milz- und Lymphknotenzellen fand sich sogar eine teilweise deutliche und statistisch signifikante Erhöhung der mBSA-spezifischen Antwort in den Rezipienten sowohl von $CD4^+CD25^-$ Zellen als auch von $CD4^+CD25^+$ Zellen. Dies lässt vermuten, dass es sich hierbei eher um eine unspezifische Reaktion auf den Zelltransfer handelt.

Der Transfer von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen führte reproduzierbar zu einer geringen Reduktion des mBSA-spezifischen IgGs in den Rezipienten. Dies ist hinweisend auf eine mögliche direkte Suppression von B-Zellen durch T_{reg} -Zellen *in vivo*, wie sie bereits *in vitro* beschrieben wurde (Nakamura et al. 2001, Bystry et al. 2001). Auch dieser Befund kann den antiarthritischen Effekt der T_{reg} -Zellen *in vivo* nicht ausreichend erklären.

Die Untersuchungen des Migrationsverhaltens zeigten, dass die $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen sowohl in Lymphknoten (wenn auch deutlich weniger als $CD4^+CD25^-$ Zellen), und auch direkt im entzündeten Gewebe gefunden werden können. Möglicherweise ist der Suppressionseffekt also lokal begrenzt auf den drainierenden Lymphknoten und das entzündete Gewebe.

4.3 Transfer von $\alpha_E\beta_7$ -exprimierenden regulatorischen T-Zell-Subsets

4.3.1 Effekt auf die Arthritisschwere

In weiteren Experimenten wurden auch $\alpha_E\beta_7$ -exprimierende T_{reg} -Zellen hinsichtlich ihrer arthritissupprimierenden Wirksamkeit getestet. Dazu wurden aus Milz- und Lymphknotenzellen naiver C57Bl/6-Mäusen mit einer Kombination aus immunomagnetischer und durchflusszytometrischer Zellsortierung folgende Subsets isoliert: $CD4^+CD25^- \alpha_E\beta_7^-$, $CD4^+CD25^+ \alpha_E\beta_7^-$, $CD4^+CD25^- \alpha_E\beta_7^+$ und $CD4^+CD25^+ \alpha_E\beta_7^+$. Die so isolierten Zellen wurden präaktiviert (24 Stunden) und abweichend zu den oben beschriebenen Experimenten einen Tag vor der AIA-Induktion (d -1) in immunisierte Tiere transferiert ($0,2 \times 10^6$ Zellen/Tier). Die Kontrollgruppe erhielt PBS. Es zeigte sich, dass nur die $\alpha_E\beta_7$ -exprimierenden T_{reg} -Zellen ($CD4^+CD25^- \alpha_E\beta_7^+$, $CD4^+CD25^+ \alpha_E\beta_7^+$) bereits in der akuten Phase in der Lage waren, die klinische Schwere der AIA zu unterdrücken (Abb. 27A). Auch bei der histologischen Analyse zeigten diese Zellen den stärksten Effekt, es stellte sich allerdings heraus, dass auch $CD4^+ \alpha_E\beta_7^- CD25^+$ Zellen einen, wenn auch geringeren, Einfluss auf die Schwere der AIA haben (Abb. 27B).

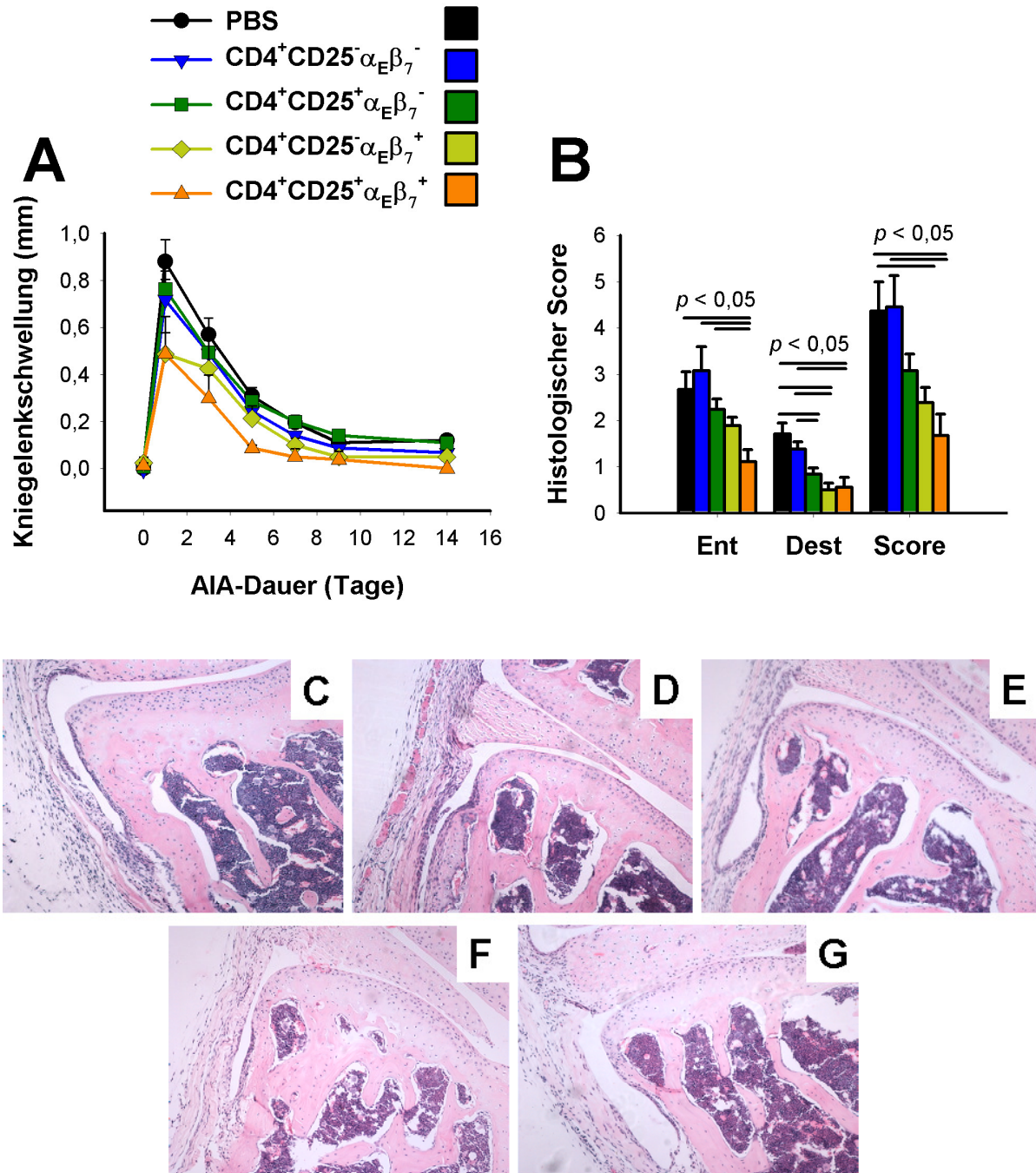


Abbildung 27: $\alpha_E \beta_7$ exprimierende T_{reg} -Zellen sind potentere Suppressoren der AIA als $CD4^+CD25^+ \alpha_E \beta_7^-$ Zellen. A. Klinische Schwere der AIA. B. Histologische Schwere der AIA. $0,2 \times 10^6$ präaktivierte Zellen oder PBS wurden 1 Tag vor der AIA-Induktion in die Rezipienten transferiert. (PBS $n=10$, $CD4^+CD25^- \alpha_E \beta_7^-$ $n=11$, $CD4^+CD25^+ \alpha_E \beta_7^-$ $n=11$, $CD4^+CD25^- \alpha_E \beta_7^+$ $n=4$, $CD4^+CD25^+ \alpha_E \beta_7^+$ $n=4$; signifikante Gruppenunterschiede sind direkt im Diagramm angegeben; Mann-Whitney U -Test). Repräsentative mikrophotografische Aufnahme von Rezipienten von PBS (C), $CD4^+CD25^- \alpha_E \beta_7^-$ Zellen (D), $CD4^+CD25^+ \alpha_E \beta_7^-$ Zellen (E), $CD4^+CD25^- \alpha_E \beta_7^+$ Zellen (F) oder $CD4^+CD25^+ \alpha_E \beta_7^+$ Zellen (G).

In einem weiteren Experiment wurden $0,5 \times 10^6$ präaktivierte $CD4^+CD25^- \alpha_E \beta_7^+$ beziehungsweise $CD4^+CD25^+ \alpha_E \beta_7^-$ Zellen transferiert. Auch hier zeigte das $\alpha_E \beta_7$ -exprimierende Subset eine stärkere Wirksamkeit als die $CD4^+CD25^+ \alpha_E \beta_7^-$ Zellen (Abb. 28A).

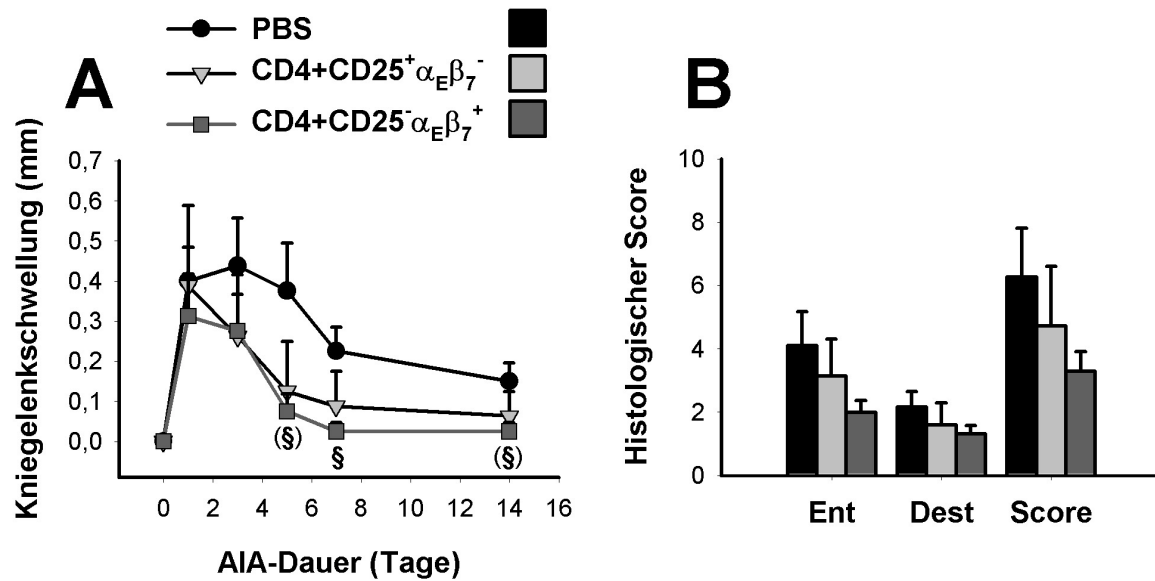


Abbildung 28: Vergleich von $CD4^+CD25^-αEβ_7^+$ mit $CD4^+CD25^+αEβ_7^-$ T_{reg} -Zellen. A. Klinische Schwere der AIA. B. Histologische Schwere der AIA. $0,5 \times 10^6$ präaktivierte Zellen oder PBS wurden 1 Tag vor der AIA-Induktion in die Rezipienten transferiert. ($CD4^+CD25^-αEβ_7^+$ $n=5$, $CD4^+CD25^+αEβ_7^-$ $n=4$, PBS $n=4$; (§) $p < 0,1$; § $p < 0,05$ $CD4^+CD25^-αEβ_7^+$ gegen PBS; Mann-Whitney U-Test).

Weil $CD4^+CD25^+αEβ_7^+$ Zellen, im Gegensatz zu $CD4^+CD25^+αEβ_7^-$ Zellen, *in vitro* in der Lage sind, die IL-10-Produktion von $CD4^+CD25^-αEβ_7^-$ Zellen zu steigern (Banz et al. 2003), wurde überprüft, ob solch ein Effekt für die unterschiedliche Wirksamkeit dieser Subsets *in vivo* verantwortlich sein könnte. Dazu wurde die mBSA-spezifische Zytokinproduktion in den drainierenden Lymphknoten mittels IL-10-Sekretionsassay gemessen. Deutliche Gruppenunterschiede konnten nicht demonstriert werden. Auch die Anzahl der CD4-negativen IL-10-Produzenten (hauptsächlich B-Zellen; B-220-positiv) war in den Gruppen nicht unterschiedlich (Daten nicht gezeigt).

Die Bestimmung von Immunparametern der Rezipienten der verschiedenen T_{reg} -Subsets ergab keine deutlichen, den antiarthritischen Effekt erklärenden Befunde (DTH, Proliferation und Zytokinproduktion von Milz- und Lymphknotenzellen, Serum-IgG gegen mBSA, Kollagen Typ I und II, Proteoglykane, IgG-Subklassen; Daten nicht gezeigt).

Auch mit den $αEβ_7$ -exprimierenden T_{reg} -Zellen wurde versucht, eine bereits etablierte Arthritis therapeutisch zu beeinflussen. Dazu wurden 1×10^6 frisch isolierte oder *in vitro* präaktivierte Zellen in Rezipienten am Tag 7 der AIA transferiert. Weder mit $CD4^+CD25^-αEβ_7^+$ noch mit $CD4^+CD25^+αEβ_7^-$ T_{reg} -Zellen ließ sich ein Effekt auf die Arthritisschwere nachweisen (Abb. 29A und B).

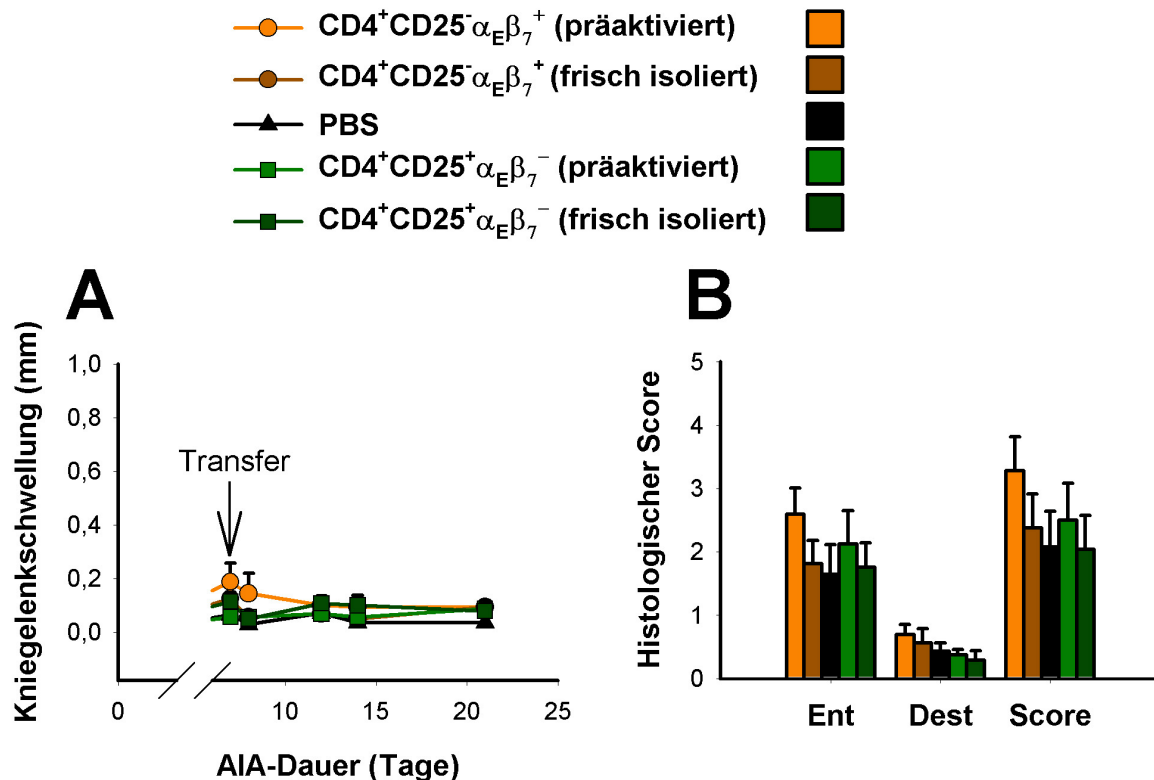


Abbildung 29: Transfer von 1×10^6 frisch isolierten oder *in vitro* präaktivierten CD4⁺CD25⁻α_Eβ₇⁺ bzw. CD4⁺CD25⁺α_Eβ₇⁻ Zellen in AIA-Tiere am Tag 7 der Arthritis (Pfeil). Weder präaktivierte noch frisch isolierte Zellen hatten einen Einfluss auf die Gelenkschwellung (A) oder die histologische Schwere der Arthritis (B). ($n=8$ je Gruppe)

4.3.2 Migrationsverhalten von α_Eβ₇-exprimierenden T_{reg}-Subsets

Um das Migrationsverhalten der verschiedenen T_{reg}-Subsets *in vivo* zu untersuchen, wurden diese Zellen aus naiven Tieren isoliert, radioaktiv markiert (¹¹¹Indium) und am Tag 4 in Tiere mit AIA transferiert. Nach 24 Stunden wurde die Verteilung der Radioaktivität in den verschiedenen Organen gemessen (Abb. 30).

Die verschiedenen T_{reg}-Zell-Subsets zeigten ein deutlich unterschiedliches Migrationsverhalten. Alle T_{reg}-Zell-Subsets (CD4⁺CD25⁺α_Eβ₇⁻, CD4⁺CD25⁺α_Eβ₇⁺ oder CD4⁺CD25⁻α_Eβ₇⁺) waren signifikant besser in der Lage ($p < 0,001$; 2-seitiger *t*-Test) in die Leber einzuwandern als naive CD4⁺CD25⁻α_Eβ₇⁻ T-Zellen. Aber auch die T_{reg}-Zell-Subsets zeigten untereinander hochsignifikante Unterschiede bezüglich ihrer Einwanderung in die Leber ($p < 0,001$ für CD4⁺CD25⁻α_Eβ₇⁺ gegen CD4⁺CD25⁺α_Eβ₇⁺ oder CD4⁺CD25⁺α_Eβ₇⁻; $p < 0,001$ für CD4⁺CD25⁺α_Eβ₇⁺ gegen CD4⁺CD25⁺α_Eβ₇⁻). Bei der Einwanderung in die Milz und die peripheren bzw. drainierenden Lymphknoten zeigte sich ein genau umgekehrtes Bild: Die naiven T-Zellen (CD4⁺CD25⁻α_Eβ₇⁻) zeigten eine signifikant stärkere Anreicherung als die α_Eβ₇-exprimierenden T_{reg}-

Zellen in diesen Organen ($p < 0,05$ gegen $CD4^+CD25^+\alpha_E\beta_7^+$ oder $CD4^+CD25^-\alpha_E\beta_7^+$). Der Unterschied zwischen naiven $CD4^+CD25^-\alpha_E\beta_7^-$ Zellen und $CD4^+CD25^+\alpha_E\beta_7^-$ T_{reg} -Zellen war nicht statistisch signifikant.

Beide $\alpha_E\beta_7$ -exprimierenden Subsets waren signifikant besser in der Lage, das arthritische Gelenk zu erreichen ($p < 0,05$) als die $CD4^+CD25^+\alpha_E\beta_7^-$ T_{reg} -Zellen oder naive ($CD4^+CD25^-\alpha_E\beta_7^-$) T-Zellen.

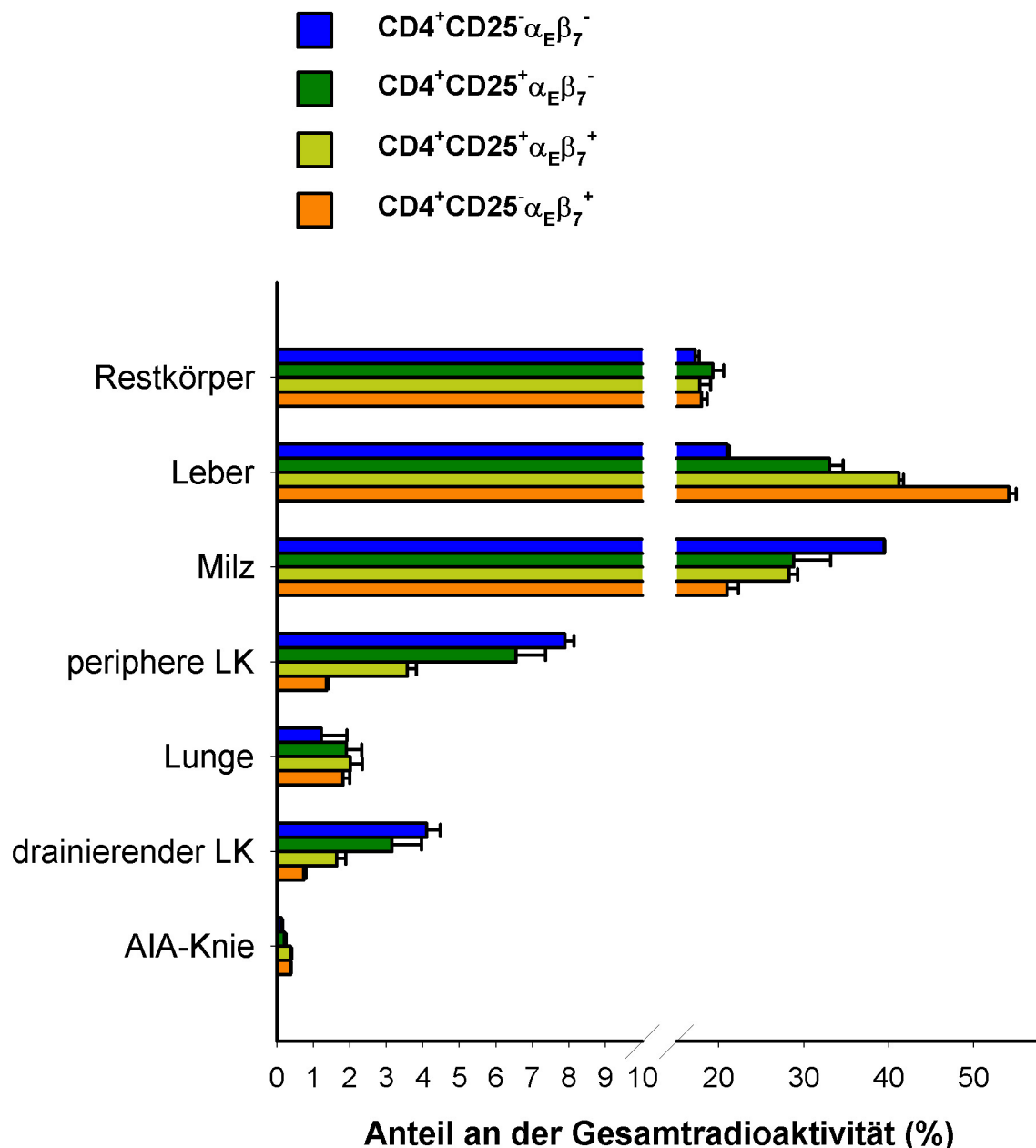


Abbildung 30: Migration von $CD4^+CD25^-\alpha_E\beta_7^-$, $CD4^+CD25^+\alpha_E\beta_7^-$, $CD4^+CD25^-\alpha_E\beta_7^+$ und $CD4^+CD25^+\alpha_E\beta_7^+$ T_{reg} -Zell-Subsets. Die isolierten Subsets wurden radioaktiv markiert und i.v. in AIA-Rezipienten (d4) transferiert. Nach 24 Stunden wurde die Verteilung der Radioaktivität in verschiedenen Organen gemessen. ($n=5$ pro Gruppe, signifikante Gruppenunterschiede sind im Text angegeben)

Insgesamt zeigen die $\alpha_E\beta_7$ -exprimierenden T_{reg} -Zellen in diesem Experiment ein für Memory/Effektor-Zellen typisches Migrationsverhalten (Einwanderung in Gewebe, geringe Rezirkulation in Lymphorganen) während sich sowohl die $CD4^+CD25^-\alpha_E\beta_7^-$ Zellen als auch die $CD4^+CD25^+\alpha_E\beta_7^-$ T_{reg} -Zellen mehr wie naive T-Zellen verhalten.

4.3.3 Zusammenfassung

$CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen, die das Integrin $\alpha_E\beta_7$ exprimieren, sind potentere Suppressoren der AIA, als $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen, die dieses Molekül nicht besitzen. Darüber hinaus sind auch $CD4^+CD25^-$ Zellen, die $\alpha_E\beta_7$ exprimieren, in der Lage, die AIA zu supprimieren.

Die antiarthritische Wirksamkeit von $\alpha_E\beta_7$ -exprimierenden T_{reg} -Zellen war mit ihrer Fähigkeit korreliert, direkt in das entzündete Gelenk einwandern zu können.

Wie die $CD4^+CD25^+$ Gesamtpopulation, sind auch die $\alpha_E\beta_7$ -exprimierenden Subsets nicht in der Lage, eine bereits etablierte Arthritis zu beeinflussen. Analysen der zellulären und humoralen Immunität in den Rezipienten dieser Zellen konnten keinen eindeutigen Mechanismus der Suppression aufzeigen.

5 Diskussion

Kontrolle der Autoimmunität

Der Antigenrezeptor von T-Zellen wird zufällig aus verschiedenen Gensegmenten kombiniert, was eine breite Spezifität der Rezeptoren ermöglicht, andererseits entstehen so auch potentiell autoreaktive T-Zellen. Eine der wichtigsten Fähigkeiten des Immunsystems ist daher die Verhinderung von Immunreaktionen gegen körpereigene Antigene. An der Aufrechterhaltung dieser als immunologische Toleranz bezeichneten Eigenschaft sind verschiedene Mechanismen beteiligt.

Der größte Teil der Zellen, die Autoantigen mit hoher Affinität erkennen können, werden während ihrer Reifung im Thymus eliminiert; ein Vorgang, der als negative Selektion bezeichnet wird (Stockinger 1999). Dieser Prozess ist nicht vollständig, daher existieren autoreaktive T-Zellen im peripheren Immunsystem von Mäusen und auch von Menschen. Diese autoreaktiven T-Zellen können durch Immunisierung mit körpereigenen Antigenen (wie z. B. Kollagen Typ II oder MBP in CFA) aktiviert werden und dadurch experimentelle Autoimmunkrankheiten (CIA, EAE) verursachen (Cohen 1986). Das seltene Auftreten klinisch relevanter Autoimmunität in unmanipulierten Mäusen oder Menschen trotz der Existenz dieser autoreaktiven T-Zellen zeigt, dass neben der zentralen Toleranz auch andere periphere Mechanismen existieren müssen, die potentiell pathogene Zellen kontrollieren. Ein solcher Mechanismus ist die Anergie, d. h. die funktionelle Inaktivierung der autoreaktiven T-Zellen, klassischerweise durch ihre Aktivierung über den TZR ohne entsprechende kostimulatorische Signale (Johnson und Jenkins 1994). Neben der Anergie und der klonalen Deletion autoreaktiver T-Zellen durch unzureichende Stimulation (Jones et al. 1990) sowie der Ignoranz von Autoantigenen in immunologisch privilegierten Organen spielen offensichtlich auch regulatorische/suppressive T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz.

Es ist bekannt, dass Mäuse, die entweder durch den Transfer von CD25-depletierten T-Zellen oder durch Defizienz bestimmter, für die Homöostase der T_{reg}-Zellen wichtigen Moleküle (IL-2, IL-2-Rezeptor- α - und β -Kette, CD28, CD80, CD86, STAT-5, FoxP3) eine reduzierte Anzahl peripherer T_{reg}-Zellen haben, alle ein Autoimmunsyndrom mit teilweise tödlichem Ausgang entwickeln (Salomon et al.

2000, Almeida et al. 2002, Furtado et al. 2002, Malek et al. 2002, Antov et al. 2003, Fontenot et al. 2003, Khattri et al. 2003, Tang et al. 2003).

Diese Tiere sind jedoch nicht nur defizient für $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen, sondern haben auch andere immunologische Defekte. So sind zum Beispiel IL-2-vermittelte Signale entscheidend für den aktivierungsinduzierten Zelltod von T-Zellen (Lenardo 1991). Die fehlende Elimination von T-Zellen kann also auch zur Immunpathologie in IL-2-, IL-2-Rezeptor- α - und β -Kette- bzw. STAT-5-defizienten Mäusen beitragen.

Auch die häufig verwendeten lymphopenischen Tiermodelle wie die $CD45RB^{high}$ T-Zell-induzierte Kolitis in SCID-Mäusen oder die Postthymektomie-Gastritis können nicht den Anteil der T_{reg} -Zellen an der Regulation unter normalen Bedingungen in nichtlymphopenischen Tieren widerspiegeln. Die Kolitis, die nach dem Transfer von naiven $CD45RB^{high}$ T-Helfer-Zellen in SCID- oder RAG-2-knockout-Mäusen entsteht, beruht auf einer unkontrollierten Proliferation dieser Zellen in den Rezipienten als Reaktion auf die lymphopenische Umgebung und/oder bakterielle Antigene (Powrie und Leach 1995). $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen können wiederum diese Proliferation und damit die Kolitisentstehung inhibieren (Annacker et al. 2001, Mottet et al. 2003). Allerdings können auch TZR-transgene T-Zellen, die eine monoklonale definierte Antigenspezifität besitzen (die für die Kolitis irrelevant ist; AND-T-Zellen), das Auftreten der Kolitis supprimieren. Für diese Suppression waren weder T_{reg} -typische Oberflächenmarker (CD25, CTLA-4) oder Suppressoraktivität *in vitro* nötig. Die Suppressoraktivität dieser TZR-transgenen T-Zellen korrelierte mit ihrer Fähigkeit, in den Rezipienten zu proliferieren. So konnten nur Rezipienten mit H-2E^k-Hintergrund (in denen die transgenen T-Zellen extrem gut proliferieren), nicht aber Rezipienten mit H-2^b-Hintergrund (nur geringe Proliferation) vor dem Auftreten der Kolitis geschützt werden. Diese T-Zell-Regulation wird durch eine Konkurrenz der transferierten Zellen um Wachstumsfaktoren (Zytokine, kostimulatorische Moleküle) erklärt (Barthlott et al. 2003). Da $CD4^+CD25^+$ Zellen in lymphopenischen Rezipienten ebenfalls gut proliferieren können, ist es möglich, dass zumindest ein Teil ihrer regulatorischen Aktivität in solchen experimentellen Systemen auf diesen Kompetitionsmechanismen beruht (Gavin et al. 2002). Dies schränkt die Aussagekraft des häufig verwendeten Kolitismodells bezüglich der Aktivität und Mechanismen des T_{reg} -Effektes *in vivo* stark ein.

Auch in nichtlymphopenischen Modellen ist die Rolle von T_{reg} -Zellen bereits untersucht worden. Kohm et al. (2000) zeigten, dass die aktiv (durch Immunisierung mit Autoantigen) und passiv (Transfer von aktivierten autoantigenspezifischen T-Zellen) induzierte EAE durch den gleichzeitigen Transfer von $CD4^+CD25^+$ Zellen aus naiven Donoren gehemmt wird. Die Immunisierung von mit anti-CD25-mAk behandelten Tieren mit Kollagen Typ II führt zu einer verstärkten CIA (Morgan et al. 2003). Dies könnte auf einen protektiven Einfluss von T_{reg} -Zellen auch in diesen nichtlymphopenischen Krankheitsmodellen hinweisen, allerdings ist zu beachten, dass die Manipulationen der T_{reg} -Anzahl in diesen Arbeiten vor oder während der Immunisierung durchgeführt wurden. Dies schränkt den Wert dieser Untersuchungen und besonders ihre Aussage über die Rolle von T_{reg} -Zellen während der Krankheitsphase deutlich ein, da die Manipulation der T_{reg} -Anzahl während der Immunisierung natürlich vorwiegend den Effekt der Immunisierung beeinflusst. Bereits in der initialen Beschreibung von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen durch Sakaguchi (Sakaguchi et al. 1995) wurde eine Verstärkung des Immunisierungseffektes in Abwesenheit dieser regulatorischen T-Zellen dokumentiert, und tatsächlich ist die zelluläre und humorale Immunantwort gegen Kollagen Typ II in CD25-depletierten Tieren stärker als in den Kontrolltieren, was der Grund der verstärkten Arthritis in diesen Experimenten ist (Morgan et al. 2003). Somit sind Schlussfolgerungen bezüglich der Rolle von $CD4^+CD25^+$ Zellen während der Arthritis aus diesen Daten nur sehr eingeschränkt möglich.

Diese hochaktuelle und wichtige Fragestellung aufzugreifen und aufzuzeigen, welche Rolle $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen nun tatsächlich in der Pathogenese der chronischen Arthritis haben, war das Ziel der vorliegenden Arbeit. Dazu wurden im wesentlichen zwei verschiedene experimentelle Ansätze gewählt, die Depletion von CD25-exprimierenden Zellen und der direkte Transfer von $CD4^+CD25^+$ Zellen in arthritische Rezipienten.

5.1 Depletionsexperimente

Die Depletion von CD25-exprimierenden Zellen *in vivo* kann durch die Injektion eines monoklonalen Antikörpers gegen dieses Molekül relativ einfach erreicht werden (Onizuka et al. 1999, Jones et al. 2002, McHugh und Shevach 2002, Zhang et al. 2004). Da das CD25-Molekül jedoch nicht spezifisch für T_{reg} -Zellen ist, sondern auch auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, ist der Zeitpunkt der Antikörperbehandlung

entscheidend für den Effekt der Therapie. Die Injektion von anti-CD25 zum Zeitpunkt der Immunisierung kann durch eine Depletion von aktivierten Effektor-T-Zellen die Entwicklung der CIA verhindern (Banerjee et al. 1988), während sich durch eine Behandlung zwei Wochen vor der Immunisierung die CIA deutlich verschlimmert, was auf das Fehlen von CD4⁺CD25⁺ Zellen zurückgeführt wird (Morgan et al. 2003).

Um Aufschluss über die Rolle von T_{reg}-Zellen in der AIA zu gewinnen, war es zunächst notwendig, diese Zellen in immunisierten Tieren zu depletieren. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde eine im Vergleich mit anderen Studien relative geringe Menge des mAk zehn und zwölf Tage nach der Booster-Immunisierung, d.h. vier und zwei Tage vor der Arthritisinduktion, injiziert. Durch diese Behandlung wurde die Anzahl der CD25-exprimierenden Zellen, insbesondere solche mit einer starken Expression, deutlich reduziert. CD4⁺ T-Zellen mit starker CD25-Expression sind im Humansystem als eigentliche regulatorische T-Zellen identifiziert worden, während es sich bei Zellen mit geringer und mittlerer CD25-Expression um Effektor-T-Zellen handelt (Baecher-Allan et al. 2001). Auch im murinen System haben T_{reg}-Zellen eine deutlich stärkere CD25-Expression als aktivierte T-Zellen (Klein et al. 2003, de la Rosa et al. 2003). Besonders die Verschlimmerung der Arthritis und die verstärkten Immunreaktionen machen es wahrscheinlich, dass mit diesem experimentellen Ansatz vorwiegend T_{reg}-Zellen und nicht die Effektor-T-Zellen eliminiert werden.

Die AIA verlief in den CD25-depletierten Tieren klinisch deutlich schwerer als in den Kontrolltieren. Dies konnte durch die histologische Untersuchung der Gelenke am Versuchsende bestätigt werden. Dieser Effekt war teilweise reversibel, wenn depletierte Tiere wieder durch den Transfer von CD4⁺CD25⁺ Zellen am Tag 7 der AIA rekonstituiert worden. Da CD25 nicht nur auf CD4⁺ T-Zellen, sondern auch auf CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und anderen Zellen exprimiert wird, kann dadurch gezeigt werden, dass die verstärkte AIA tatsächlich auf die Abwesenheit von CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen zurückzuführen war. Allerdings konnte durch den alleinigen Transfer von T_{reg}-Zellen in Tiere mit AIA (ohne vorherige anti-CD25-Behandlung) am Tag 7 der Arthritis kein therapeutischer Effekt auf die Arthritis demonstriert werden. Diese widersprüchlichen Befunde lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass der geringe Effekt des Zelltransfers am Tag 7 der AIA nur unter den Bedingungen der exazerbierten Arthritis in den CD25-depletierten, nicht aber im normalen Ablauf der Arthritis nachweisbar ist.

Die Arthritis verläuft in den CD25-depletierten Tieren bereits in der akuten Phase deutlich schwerer als in den Kontrolltieren. Diese akute Phase ist zwar bereits T-Zell-abhängig, weil sie sich durch eine Depletion der CD4⁺ T-Zellen in ihrer Schwere verringern lässt (Pohlers et al. 2004), aber Zellen des angeborenen Immunsystems stehen zweifellos im Vordergrund (Simon et al. 2001). So führt die intraartikuläre Antigeninjektion zu einer massiven Exsudation von Neutrophilen Granulozyten in den Gelenkspalt. Weiterhin kommt es in dieser Frühphase der AIA, vermutlich durch die Bildung von Immunkomplexen aus mBSA und anti-mBSA-IgG, zu einer lokalen und systemischen Makrophagenaktivierung (Simon et al. 2001). Da CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen im Modell der durch *Helicobacter hepaticus* induzierten Kolitis die Akkumulation von Neutrophilen Granulozyten und die fortdauernde Aktivierung von Zellen der angeborenen Immunantwort verhindern können (Maloy et al. 2003), ist zu vermuten, dass sie auch im Modell der AIA entweder direkt oder indirekt über die Beeinflussung der Aktivität von anderen T-Helfer-Zellen den Aktivierungszustand von Zellen der angeborenen Immunität beeinflussen können. Im Kolitismodell beruhte die Suppression auf der Sekretion der suppressiven Zytokine IL-10 und TGF- β , wie durch Injektion von blockierenden anti-IL10-Rezeptor-mAk beziehungsweise anti-TGF- β -mAk gezeigt wurde (Maloy et al. 2003). Da diese Zytokine direkt auf Makrophagen und andere Zellen wirken können, ist eine solche direkte Suppression dieser Zellen durch T_{reg}-Zellen durchaus denkbar.

Für die Chronifizierung der AIA sind CD4⁺ T-Helfer-Zellen unerlässlich, wie durch Depletions- und Transferexperimente gezeigt worden ist (Petrow et al. 1996b, Pohlers et al. 2004). Durch die Immunisierung mit dem Antigen mBSA in Komplettem Freund'schen Adjuvans kommt es zu einer starken T-Zell-Reaktivität gegen mBSA sowie gegen Autoantigene (Petrow et al. 1996a). Da in unseren Untersuchungen diese Immunisierung vor der anti-CD25-Behandlung durchgeführt wurde, ist es unwahrscheinlich, dass diese T-Zell-Reaktivität in anti-CD25-behandelten Tieren bereits zum Zeitpunkt der AIA-Induktion erhöht war. Die zelluläre Immunreaktivität gegen mBSA *in vivo*, gemessen als DTH-Reaktion 7 Tage nach der Arthritisinduktion, war in den anti-CD25-behandelten Tieren jedoch signifikant höher als in den Kontrolltieren. Auch die Untersuchung der Proliferation und Zytokinproduktion von Milz- und Lymphknotenzellen konnte dieses Ergebnis bestätigen. Zusätzlich war in den Milzzellen der mit anti-CD25-behandelten Tieren eine deutlich stärkere spontane (ohne Antigenstimulation) Proliferation und

Zytokinproduktion zu verzeichnen als in den Kontrolltieren. Dies deutet darauf hin, dass ein Großteil dieser Zellen immer noch aktiviert ist. Die hohe Anzahl CD25-exprimierender Zellen in den Milzen von anti-CD25-behandelten Mäusen am Tag 14 der AIA stützt diese Annahme. Insgesamt sind diese Befunde dahingehend zu interpretieren, dass es durch die Depletion der CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen zu einer verstärkten mBSA-spezifischen T-Zellantwort und zu einer prolongierten T-Zellaktivierung kommt. Diese verstärkte T-Zell-Reaktivität in anti-CD25-behandelten Tieren ist als Ursache der verstärkten AIA anzusehen. In der Literatur zeigen Daten, dass CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen sowohl die Induktion als auch Effektorfunktionen von CD4⁺ T-Zellen hemmen können (Suri-Payer et al. 1998). Weiterhin kommt es durch eine anti-CD25-Behandlung vor einer Infektion mit HSV zu einer prolongierten und verstärkten antiviralen CD8⁺ T-zellvermittelten Immunität (Suvas et al. 2003). Offensichtlich ist die suppressive Wirkung von T_{reg}-Zellen nicht limitiert auf Immunantworten gegen Autoantigene, obwohl CD4⁺CD25⁺ Zellen vorwiegend spezifisch für solche Antigene zu sein scheinen (Apostolou et al. 2002, Romagnoli et al. 2002), sondern erstreckt sich auch auf exogene Antigene wie mBSA in den hier dargestellten Ergebnissen sowie bakterielle, virale und parasitäre Antigene (Aseffa et al. 2002, Belkaid et al. 2002, Hori et al. 2002a, Kursar et al. 2002, Raghavan et al. 2003, Suvas et al. 2003, Hisaeda et al. 2004). T_{reg}-Zellen sind also nicht nur in der Lage, Autoimmunität zu verhindern, sondern können generell Immunantworten inhibieren. Diese Inhibition erfolgt im Falle von Infektionen sogar unter Inkaufnahme persistierender Erreger (Belkaid et al. 2002, Raghavan et al. 2003), so dass die vermutliche Aufgabe von T_{reg}-Zellen wohl darin besteht, durch die Inhibition von (möglicherweise überschießenden) Immunantworten das Auftreten von Gewebszerstörungen zu verhindern. Ein Defekt dieses Regulationssystems könnte also zu immunologisch vermittelten gewebsdestruktiven Krankheitsprozessen wie RA oder Typ-1-Diabetes beitragen. Im Falle des Diabetes ist bereits gezeigt worden, dass Patienten zum Zeitpunkt des Auftretens der Krankheit eine geringere Anzahl von T_{reg}-Zellen im peripheren Blut aufweisen (Kukreja et al. 2002).

Der in den Experimenten verwendete mAk hat eine *in vivo* Halbwertszeit von mehr als 3 Wochen (R. Suttmüller, persönliche Mitteilung). Es ist daher möglich, dass die beobachtete Erhöhung der zellulären Immunreaktivität auch zum Teil durch eine Blockade der Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor durch noch vorhandene Antikörper vermittelt wird. Einerseits ist klar, dass IL-2, die α - und β -Kette seines

Rezeptors und seine Signaltransduktionsmoleküle (STAT-5) für die regulatorische Aktivität von T_{reg}-Zellen absolut notwendig sind (Almeida et al. 2002, Furtado et al. 2002, Malek et al. 2002, Antov et al. 2003, de la Rosa et al. 2003). Neben einer Depletion der T_{reg}-Zellen durch die Antikörperbehandlung ist also auch eine Hemmung ihrer Aktivität durch die Blockade der IL-2-Wirkungen möglich (de la Rosa et al. 2003). Darüber hinaus kann auch der aktivierungsinduzierte Zelltod der pathogenen T-Zellen, der IL-2 abhängig ist, beeinträchtigt sein (Lenardo 1991).

In den anti-CD25-behandelten Tieren war eine signifikante Erhöhung des mBSA-spezifischen sowie der gegen Kollagen Typ I und II und Proteoglykane gerichteten knorpelmatrixspezifischen IgG zu verzeichnen. Die Produktion dieser Antikörper ist eine Folge der Immunisierung (Bräuer et al. 1994), somit ist es unwahrscheinlich, dass sich die Gruppen bezüglich dieser IgG-Produktion zum Zeitpunkt der Arthritisauslösung unterschieden. Deswegen fällt eine erhöhte IgG-Produktion als Ursache der schwereren AIA in den CD25-depletierten Tieren aus. Die erhöhte IgG-Produktion ist als Folge der T_{reg}-Depletion anzusehen; auch der Transfer von CD25-depletierten Milzzellen in immundefiziente Rezipienten führt zur Produktion von Autoantikörpern (Sakaguchi et al. 1995, Bystry et al. 2001). Ob dies *in vivo* die Folge einer fehlenden direkten oder indirekten (durch fehlende T-Zell-Hemmung) B-Zell-Hemmung ist, ist unklar. *In vitro* sind T_{reg}-Zellen offensichtlich in der Lage, B-Zellfunktionen durch direkte Interaktionen zu hemmen (Nakamura et al. 2001).

Diese Beeinflussung der humoralen Immunität durch T_{reg}-Zellen stellt offensichtlich eine weitere wichtige Regulationsebene dieser Zellen dar, die in ihrer Bedeutung möglicherweise noch unterschätzt wird.

Zusammenfassung

Die Depletion von T_{reg}-Zellen durch eine anti-CD25-Behandlung in immunisierten Tieren führt zu einer deutlich exazerbierten AIA. Diese klinisch und histologisch schwerere Arthritis ist als eine Folge des Fehlens der Inhibition fast aller an der Chronifizierung der AIA beteiligten Immunantworten zu interpretieren. Somit stellt die Aktivität von CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen einen wesentlichen Kontrollmechanismus in der Pathogenese der chronischen Arthritis dar.

5.2 Transfer von CD4⁺CD25⁺ Zellen

Um den inhibitorischen Effekt von T_{reg}-Zellen auf die Arthritisentstehung weiter zu untersuchen, wurden Tierexperimente mit adoptivem Transfer solcher Zellen durchgeführt. Um eine Beeinflussung des Immunisierungsstatus auszuschließen, erfolgte der Zelltransfer in den hier dargestellten Experimenten stets nach der Immunisierung, entweder zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion oder später.

Der Transfer von 2×10^6 CD4⁺CD25⁺ Zellen zum Zeitpunkt der Arthritisauslösung, der zu einer Erhöhung der Gesamt-T_{reg}-Anzahl in den Rezipienten um 50-75% führt (bei $2,5\text{-}3 \times 10^6$ endogenen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen) konnte den klinischen Verlauf der AIA signifikant inhibieren. Dieser deutliche Effekt ist erstaunlich, wenn man bedenkt, dass T_{reg}-Zellen über ihren TZR aktiviert werden müssen, um ihre suppressive Funktion auszuüben (Thornton und Shevach 2000). Da über die Antigenpezifität der T_{reg}-Zellen nur wenig bekannt ist, die bisher publizierten Daten aber darauf hinweisen, dass zumindest ein Teil von ihnen spezifisch für Autoantigene ist (Apostolou et al. 2002, Romagnoli et al. 2002, Fisson et al. 2003), könnte eine Aktivierung über die Freisetzung von Gewebsantigenen während der akuten Entzündung erfolgen. Da T_{reg}-Zellen auf TZR-Stimulation ~100fach empfindlicher als normale T-Zellen reagieren, könnten diese geringen Antigenmengen möglicherweise für eine suffiziente T_{reg}-Zell-Aktivierung ausreichen (Takahashi et al. 1998).

Es ist bekannt, dass nach der Verabreichung von Antigen in CFA CD4⁺CD25⁺ Zellen proliferieren und nach einer solchen Stimulation *in vivo* oder *in vitro* potentere Suppressoren sind (Thornton und Shevach 2000, Gavin et al. 2002, Klein et al. 2003, Yamazaki et al. 2003). Deshalb wurden in einem weiteren Experiment CD4⁺CD25⁺ Zellen zum Zeitpunkt der AIA-Induktion transferiert, die aus immunisierten Tieren isoliert wurden. Um auszuschließen, dass es sich bei diesen Zellen um aktivierte Effektor-T-Zellen handelt, wurde sie zunächst *in vitro* charakterisiert. In der Tat zeigten diese Zellen das typische Verhalten von T_{reg}-Zellen (geringe Proliferation, fehlende IL-2-Produktion, Suppression anderer T-Zellen), so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich nicht um CD25-exprimierende aktivierte Effektorzellen handelt.

Der Transfer solcher Zellen zum Zeitpunkt der AIA-Induktion war in der Lage, die klinische und histologische Arthritis schwere deutlich und signifikant zu inhibieren. Es ist jedoch unklar, ob dieser, im Vergleich zu T_{reg}-Zellen aus naiven Tieren, stärkere

Effekt der T_{reg} -Zellen aus immunisierten Tieren auf einen effizienteren Suppressionsmechanismus oder einer verbesserten Antigenspezifität durch die vorhergehende immunisierungsbedingte Aktivierung und Proliferation der T_{reg} -Zellen beruht.

In weiteren Studien wurden *in vitro* präaktivierte Zellen verwendet. Diese Stimulation erfolgte ursprünglich mit der Absicht, die T_{reg} -Zellen *in vitro* zu expandieren. Diese Expansion gelang aber trotz potenter Stimulation durch immobilisierten anti-CD3 und Kostimulation mit anti-CD28 mAk in Gegenwart hoher Dosen IL-2 nur unzureichend oder gar nicht. Allerdings waren die so vorstimulierten Zellen extrem gute Inhibitoren der AIA, wenn sie zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion transferiert wurden. So konnte sogar mit sehr niedrigen Zellzahlen (2×10^5) die Entwicklung der Arthritis fast vollständig gehemmt werden. Dies ist zweifellos die Folge der Aktivierung eines großen Teils der transferierten Zellen durch die *in vitro* Vorbehandlung. Es ist bekannt, dass T_{reg} -Zellen nach ihrer Aktivierung über ihren TZR ihre Suppressorfunktion auch ohne weitere Antigenstimulation beibehalten (Thornton und Shevach 2000) und daher die Arthritis unspezifisch supprimieren können.

Obwohl durch den adoptiven Transfer von $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion die Entstehung der AIA deutlich gehemmt werden konnte, ließ sich eine bereits induzierte Arthritis durch einen solchen Transfer am Tag 1 oder Tag 7 der Arthritis nicht therapeutisch beeinflussen.

Um zu untersuchen, ob dem Suppressionseffekt eine systemische Hemmung der antigenspezifischen T-Zellantwort, also das Gegenteil der verstärkten T-Zellantwort der Depletionsexperimente, zugrunde liegt, wurde wieder die DTH und die Proliferation *ex vivo* isolierter Milz- und Lymphknotenzellen untersucht. In keinem der durchgeführten Experimente war die DTH durch den Transfer von $CD4^+CD25^+$ Zellen signifikant supprimiert. Die Proliferation und Zytokinproduktion war in den Milzzellen der Rezipienten sowohl der $CD4^+CD25^-$ als auch der $CD4^+CD25^+$ Zellen im Vergleich zur PBS-Gruppe überraschenderweise erhöht. Auch in den Lymphknoten zeigte sich keine Verringerung der Zytokinproduktion in den T_{reg} -Zell-Rezipienten Vergleich zur PBS-Gruppe. Allerdings lagen die Werte deutlich unter den Werten der $CD4^+CD25^-$ Zellen. Diese Daten schließen eine systemische Hemmung der T-Zellreaktivität als Ursache einer Arthritis-suppression durch den adoptiven Transfer von $CD4^+CD25^+$ Zellen aus. Kohm et al. (2002) zeigte bei seinen Experimenten in

der EAE, dass es durch den adoptiven Transfer von T_{reg} -Zellen zu einer Verstärkung der antigenspezifischen T_H2 -Antwort kommt, während die T_H1 -Antwort unbeeinflusst bleibt. Diese Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen T_H1 - und T_H2 -Zellen wurde als ursächlich für die geringere Schwere der EAE angesehen. Da der T_{reg} -Transfer in diesen Experimenten aber zum Zeitpunkt der Immunisierung durchgeführt wurde, ist es wahrscheinlich, dass diese veränderte T-Zell-Antwort eher die Folge einer Beeinflussung der Immunsierung widerspiegelt. Außerdem wurde lediglich die Zytokinproduktion der Rezipienten von $CD4^+CD25^+$ beziehungsweise $CD4^+CD25^-$ Zellen, nicht aber der Kontrollgruppe ohne Zelltransfer untersucht, obwohl eine solche Kontrollgruppe in den Experimenten mitgeführt wurde. Es ist daher aus diesen Daten nicht ersichtlich, ob sich die Zytokinproduktion in den Rezipienten der T_{reg} -Zellen gegenüber der PBS-Kontrollgruppe überhaupt unterscheidet und damit die Ursache der verringerten EAE-Schwere sein kann. Die Daten aus den hier dargestellten eigenen Experimenten jedenfalls lassen keine Modulation der T_H1/T_H2 -Balance erkennen, weder auf der Ebene der Zytokinproduktion, noch auf der Ebene der IgG-Subklassen.

Eine geringe, nicht signifikante Reduktion des anti-mBSA-IgG im Serum der Rezipienten von $CD4^+CD25^+$ Zellen konnte in verschiedenen Experimenten gemessen werden. Dies kann eine Folge einer direkten oder indirekten Hemmung von B-Zellen durch T_{reg} -Zellen sein (Nakamura et al. 2001, Bystry et al. 2001). Es ist jedoch nicht wahrscheinlich, dass dies zum antiarthritischen Effekt des Zelltransfers beiträgt.

Zusammenfassung

Durch den adoptiven Transfer von T_{reg} -Zellen zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion lässt sich eine deutliche Inhibition der AIA herbeiführen. Dies unterstreicht die Bedeutung dieser Zellen für die Regulation der Krankheitsprozesse, die zu einer chronischen Arthritis führen. Im Gegensatz zur Depletion von T_{reg} -Zellen, durch die es zu einer systemischen Verstärkung von an der Pathogenese beteiligten Immunantworten kommt, führt der adoptive Transfer nicht zu deren systemischer Hemmung. Es ist demzufolge möglich, dass der arthritissupprimierende Effekt der adoptiv transferierten T_{reg} -Zellen ein vorwiegend lokales Geschehen darstellt. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde das Migrationsverhalten dieser Zellen untersucht.

5.3 Migration von CD4⁺CD25⁺ Zellen *in vivo*

Der Suppressionsmechanismus der T_{reg}-Zellen *in vitro* ist zellkontaktabhängig (Takahashi et al. 1998, Thornton und Shevach 2000, Baecher-Allan et al. 2001). Deswegen ist möglicherweise ihre genaue Lokalisation *in vivo* bedeutsam für ihre immunregulatorischen Eigenschaften. Es ist daher erstaunlich, dass bislang noch relativ wenig über das Migrationsverhalten von regulatorischen T-Zellen *in vivo* bekannt ist. Gesteuert wird das Migrationsverhalten von T-Zellen durch Chemokine und Adhäsionsmoleküle.

Tatsächlich besitzen CD4⁺CD25⁺ Zellen Rezeptoren für bestimmte Chemokine. So exprimieren murine und humane T_{reg}-Zellen zum Beispiel CCR5 und können damit entlang eines Gradienten von CCL4, des Liganden für diesen Rezeptor, migrieren (Bystry et al. 2001, Szanya et al. 2002, D'Ambrosio et al. 2003). CCL4 wiederum wird von aktivierten B-Zellen und anderen APZ produziert (Bystry et al. 2001). Im Humansystem exprimieren T_{reg}-Zellen aus dem peripheren Blut zusätzlich CCR4 und CCR8 und können dadurch über CCL17 und CCL22 von reifen DZ rekrutiert werden (Iellem et al. 2001). Somit ist wahrscheinlich, dass eine Chemoattraktion von T_{reg}-Zellen durch aktivierte APZ stattfindet.

Darüber hinaus besitzen zumindest ein Teil der CD4⁺CD25⁺ Zellen einen aktivierten Phänotyp (CD44^{high}, CD45RB^{low}, partiell CD62L^{low}, CD69L^{high}) im Gegensatz zu naiven CD4⁺CD25⁻ Zellen (McHugh et al. 2002). Tatsächlich zeigten die T_{reg}-Zellen in den hier dargestellten Experimenten ein Migrationsverhalten, dass mit diesem Phänotyp kompatibel ist (Tietz und Hamann 1997). T_{reg}-Zellen zirkulieren deutlich weniger durch die sekundären lymphoiden Organe, verglichen mit CD4⁺CD25⁻ Zellen, reichern sich aber in Geweben wie der Leber an. Darüber hinaus sind sie in der Lage, direkt das entzündete Gelenk zu erreichen. Die Menge der Radioaktivität, die im Gelenk gefunden wurde, war zwar sehr gering, entspricht aber der Menge, die nach dem Transfer von polarisierten T_h1/T_h2-Effektor-T-Zellen gefunden wird (Austrup et al. 1997). Auch der systemische Transfer von geringen Mengen (<10⁴) antigenspezifischer Milzzellen, die retroviral mit IL-10 transfiziert wurden, führte zu einer Reduktion einer Antigen-induzierten Arthritis, ohne dass die systemische Immunantwort gegen dieses Antigen beeinträchtigt wird (Setoguchi et al. 2000). Dies bedeutet, dass geringe Mengen von T-Zellen durchaus in der Lage sind, eine Entzündung direkt am Ort des Geschehens zu supprimieren. Übereinstimmend mit diesen experimentellen Daten finden sich auch in der Literatur Hinweise auf eine

Lokalisation der T_{reg} -Zellen in entzündeten Geweben. So können aus Hauttransplantaten, die aus tolerisierten primären Rezipienten entnommen und auf sekundäre Rezipienten retransplantiert wurden, funktionelle T_{reg} -Zellen auswachsen und die Abstoßung des Transplantates durch nichttolerante Lymphozyten verhindern (Graca et al. 2002a). Auch im Modell des adoptiv übertragenen Diabetes werden T_{reg} -Zellen direkt im Pankreas gefunden (Lepault und Gagnerault 2000) und in einem transgenen Diabetes-Modell wurden außerordentlich potente T_{reg} -Zellen aus den drainierenden Lymphknoten und direkt aus den Langerhans'schen Inseln isoliert (Green et al. 2002). So konnte der Diabetes in diesem Modell bereits durch den Transfer von nur 2.000 Zellen verhindert werden. Zusätzlich wurde in diesem Modell gezeigt, dass nur die T_{reg} -Zellen, die in das Pankreas oder die pankreatischen Lymphknoten einwandern, TGF- β exprimieren (Green et al. 2003). Pathogene T-Zellen, die durch einen transgenen dominant-negativen TGF- β II-Rezeptor unempfindlich für TGF- β -vermittelte Signale gemacht wurden, ließen sich nicht supprimieren (Green et al. 2003). Daher ist die Lokalisation von T_{reg} -Zellen ist also von ganz entscheidender Bedeutung, weil möglicherweise nur T_{reg} -Zellen aus der unmittelbaren Nähe des entzündlichen Geschehens in der Lage sind, wichtige Effektorfunktionen auszuführen. Dies könnte auch eine Erklärung für die unterschiedliche Rollen von TGF- β für die T_{reg} -Suppression *in vitro* und *in vivo* sein.

Darüber hinaus findet man in der SCID-Kolitis $CD4^+CD25^+$ Zellen sowohl in der Lamina propria des entzündeten Darmes als auch in den mesenterialen Lymphknoten. In diesem System wurde sogar gezeigt, dass $CD4^+CD25^+$ Zellen zusammen mit $CD11c^+$ APZ und pathogenen T-Zellen Cluster bilden (Mottet et al. 2003).

Unklar bleibt, ob der Suppression im Lymphknoten oder der direkt im entzündeten Areal eine größere Bedeutung zukommt. $CD4^+CD25^+$ T-Zellen sind keine homogene Population und bestehen aus Subsets, die sich bezüglich ihres Migrationsverhaltens unterscheiden. So lassen sich $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen in $CD62L^+$ und $CD62L^-$ Zellen unterteilen. $CD62L^+$ T_{reg} -Zellen exprimieren CCR7 und reagieren auf die lymphoiden Chemokine MIP3 β (macrophage inflammatory protein 3 β) und SLC (secondary lymphoid chemokine). Die $CD62L^-$ Zellen hingegen exprimieren CCR2, CCR4 und CXCR3 und reagieren auf die korrespondierenden inflammatorischen Chemokine MIG (monokine induced by IFN- γ), IP-10 (IFN- γ -inducible protein 10), MDC

(monocyte-derived chemokine) und TARC (thymus- and activation regulated chemokine). Ungeachtet der gleichen *in vitro* Suppressionsaktivität waren *in vivo* nur CD62L⁺ T_{reg}-Zellen in der Lage, die Induktion von Diabetes durch kotransferierte pathogene T-Zellen zu verzögern (Szanya et al. 2002). Die Expression von CD62L und CCR7 ist eine Voraussetzung für den Eintritt von Lymphozyten in die Lymphknoten (Sallusto et al. 1999), so dass spekuliert werden könnte, dass die Regulation in diesem System im Lymphknoten stattfindet. Allerdings können die transferierten T_{reg}-Zellen die Langerhans'schen Inseln infiltrieren und diese infiltrierenden T_{reg}-Zellen haben dann ihre CD62L-Expression verloren. Außerdem ist das CD62L-Molekül für die Suppressoraktivität *in vivo* nicht nötig (Lepault und Gagnerault 2000).

Zusammenfassung

Die adoptiv transferierten T_{reg}-Zellen sind wegen der Expression von Chemokinrezeptoren und Homingmolekülen in der Lage, sowohl direkt in entzündete Gebiete als auch in die drainierenden Lymphknoten einzuwandern. Dies, und die Tatsache, dass es durch den Transfer solcher Zellen nicht zu einer detektierbaren systemischen Immunsuppression kommt, machen es wahrscheinlich, dass die Suppression der AIA lokal, d.h. entweder direkt im entzündeten Gewebe oder in den drainierenden Lymphknoten stattfindet. Unklar ist, welche der beiden Lokalisationen wichtiger ist.

5.4 Transfer von $\alpha_E\beta_7$ -exprimierenden T_{reg}-Subsets

Das Integrin $\alpha_E\beta_7$ (CD103) kann, ebenso wie CD62L und andere Moleküle (GITR, LAP) Subsets von CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen identifizieren. All diese Subsets besitzen *in vitro* oder *in vivo* Suppressoreigenschaften. Übereinstimmend sind von mehreren Autoren $\alpha_E\beta_7$ -exprimierende T_{reg}-Zellen als effizientere Suppressoren beschrieben worden, verglichen mit $\alpha_E\beta_7^-$ Zellen (Lehmann et al. 2002, Banz et al. 2003). Darüber hinaus identifiziert die Expression dieses Moleküles auch regulatorische T-Zellen, die kein CD25-exprimieren (Lehmann et al. 2002). Im Modell der SCID-Kolitis sind die $\alpha_E\beta_7$ -exprimierenden T_{reg}-Zellen, sowohl CD25⁺ als auch CD25⁻, stärker protektiv wirksam als $\alpha_E\beta_7^-$ Zellen. Da $\alpha_E\beta_7$ als Marker für intraepitheliale Lymphozyten angesehen wird, der eine Rolle bei der Retention von T-Zellen in epithelialen

Kompartimenten spielt, kann möglicherweise ein besseres Homing im Darm der Grund für die stärkere Wirksamkeit in der Kolitis sein (Lehmann et al. 2002).

Um die Ursache der beobachteten unterschiedlichen Wirksamkeit *in vivo* näher zu untersuchen, wurden die verschiedenen Zellpopulationen einer globalen Gen-Expressionsanalyse unterworfen. Hierbei zeigte sich eine Überexpression von CD62L und CCR7 in $\alpha_E\beta_7^-$ Zellen, während die $\alpha_E\beta_7^+$ Zellen verschiedene Rezeptoren für inflammatorische Chemokine (CCR2, CCR6, CXCR3) und Memory/Effektor-Moleküle (CD45RB^{low}, CD44, CD69) sowie Adhäsions- und Homingmoleküle (CD54, LFA-1, β_1 -Integrin, P- und E-Selektin-Ligand) überexprimieren (Huehn et al. 2004). In einem *in vitro* Migrationsassay konnten korrespondierende Unterschiede in der Migrationsfähigkeit dieser Zellen *in vitro* nachgewiesen werden: $\alpha_E\beta_7^-$ Zellen reagierten besonders gut auf das lymphoide Chemokin CCL19 (CCR7-Ligand), während $\alpha_E\beta_7^+$ Zellen besonders gut auf die inflammatorischen Chemokine CXCL9 (CXCR3-Ligand), CCL17 (CCR4-Ligand) und CCL20 (CCR6-Ligand) reagierten. Die Expression von $\alpha_E\beta_7$ unterscheidet somit naive ($\alpha_E\beta_7^-$) von Memory/Effektor-T_{reg}-Zellen ($\alpha_E\beta_7^+$) (Abb. 5 und Huehn et al. 2004).

In vivo Migrationstudien mit radioaktiv markierten Zellen in naiven Mäusen zeigten, dass CD4⁺CD25⁺ $\alpha_E\beta_7^-$ Zellen ihrem naiven Phänotyp entsprechend (CD62L^{high}, CCR7⁺) in den sekundären Lymphorganen rezirkulieren, während sich die $\alpha_E\beta_7^+$ Subsets in Geweben, wie zum Beispiel der Leber, anreicherten. In einem Entzündungsmodell der Haut konnte zusätzlich gezeigt werden, dass $\alpha_E\beta_7^+$ exprimierende Subsets im Gegensatz zu $\alpha_E\beta_7^-$ Zellen in der Lage sind, direkt in das entzündete Gebiet einzuwandern. Deswegen wurde im Modell der AIA untersucht, ob diese unterschiedlichen Migrationseigenschaften auch von funktioneller Bedeutung sind. Tatsächlich konnten $\alpha_E\beta_7^+$ T_{reg}-Zellen die AIA besser supprimieren als die $\alpha_E\beta_7^-$ Zellen. Die Untersuchung des Homingverhaltens der verschiedenen Subsets in AIA-Tieren zeigte, dass die $\alpha_E\beta_7^+$ Zellen signifikant besser in der Lage sind, in das entzündete Gelenk einzuwandern.

Die Korrelation zwischen besserer antiarthritischer Wirksamkeit der $\alpha_E\beta_7^+$ T_{reg}-Zellen und ihrer besseren Homingkapazität für entzündete Gewebe ist als Beleg dafür zu werten, dass die Regulation von entzündlichen Vorgängen direkt im entzündeten Gewebe effizienter ist und ihr daher eine größere Bedeutung zukommt als

Regulationsmechanismen, die sich nur in den drainierenden Lymphknoten abspielen. Allerdings ist es möglich, dass $\alpha_E\beta_7^+$ T_{reg}-Zellen auch andere Effektormechanismen benutzen und deswegen potentere Suppressoren sind: Die Expression von $\alpha_E\beta_7$ kann autokrin durch TGF- β heraufreguliert werden. So exprimiert ein Großteil der $\alpha_E\beta_7^+$ Zellen LAP, was auf einen TGF- β -abhängigen Mechanismus hinweist (Oida et al. 2003, H. Weiner, persönliche Mitteilung). Zusätzlich ist bekannt, dass der proliferationshemmende Effekt von $\alpha_E\beta_7^+$ T_{reg}-Zellen, nicht aber von $\alpha_E\beta_7^-$ T_{reg}-Zellen, auf normale T-Zellen *in vitro* durch anti-TGF- β mAk zum Teil aufgehoben wird (Lehmann et al. 2002).

Der Transfer von $\alpha_E\beta_7^+$ Subsets in Tiere mit etablierter Arthritis (d 7) war wie der Transfer von CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen nicht therapeutisch wirksam. Diese Ergebnisse lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass die transferierten T_{reg}-Zellen im entzündeten Gelenk (oder drainierenden Lymphknoten) inaktiviert oder die pathogenen T-Zellen für die Suppression durch T_{reg}-Zellen unempfindlich werden. Da T_{reg}-Zellen nicht nur Immunantworten gegen Autoantigene, sondern auch gegen Pathogene unterdrücken können (Aseffa et al. 2002, Belkaid et al. 2002, Hori et al. 2002a, Kursar et al. 2002, Raghavan et al. 2003, Suvas et al. 2003, Hisaeda et al. 2004), muss ihre Aktivität reguliert werden. So wird der T_{reg}-Suppressionseffekt auf normale T-Zellen in Gegenwart aktivierter DZ gehemmt. Dieser Mechanismus wird über IL-6 vermittelt und beruht auf einer geringeren Empfindlichkeit der normalen T-Zellen auf den Suppressionseffekt (Pasare und Medzhitov 2003). Es ist bekannt, dass IL-6 in großen Mengen in der AIA-Synovialmembran produziert wird (Hersmann et al. 1998, Mentzel und Bräuer 1998, Simon et al. 2001), daher ist eine solche Kontrasuppression der T_{reg}-Zellen im arthritischen Gelenk durchaus möglich (Abb. 31).

Auch eine Stimulation von normalen T-Zellen über GITR/GITR-Ligand-Interaktionen kann diese für die Suppression durch T_{reg}-Zellen unempfindlich machen. GITR-Ligand wird von aktivierten DZ und F4/80-positiven Makrophagen exprimiert (Tone et al. 2003). Ein Großteil der Makrophagen im AIA-Gelenk exprimiert F4/80 (Hansch et al. 2004), und es ist daher möglich, dass auch GITR-Ligand im AIA-Gelenk exprimiert wird. Die Expression dieses Moleküls wird derzeit von uns untersucht. Es ist wahrscheinlich, dass T_{reg}-Zellen unter den inflammatorischen Bedingungen in der

etablierten AIA funktionell inaktiviert werden und deswegen keinen therapeutischen Effekt haben (Abb. 31).

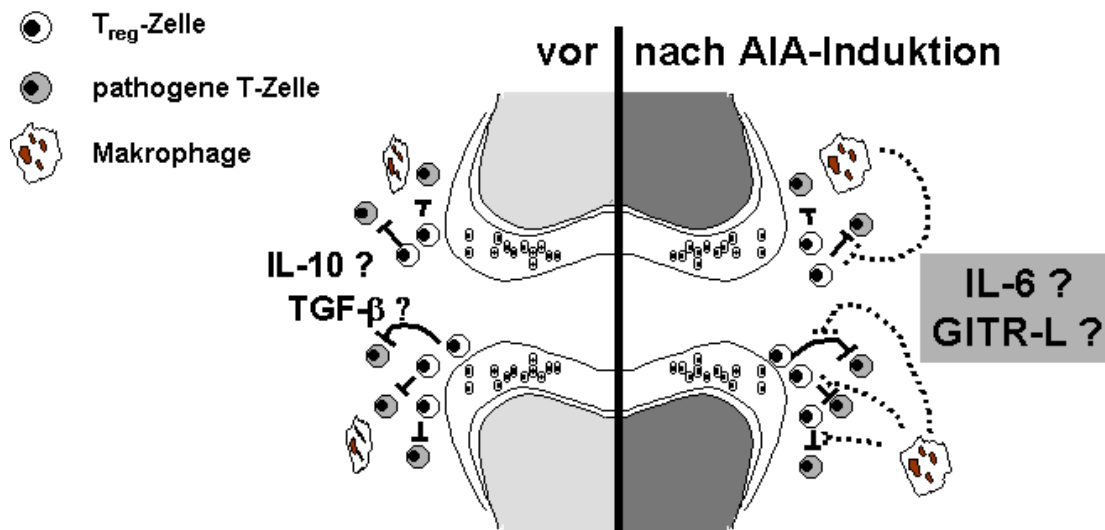


Abbildung 31: Inaktivierung der T_{reg}-Funktion in der etablierten AIA? Transfer von T_{reg}-Zellen zum Zeitpunkt der AIA-Induktion kann über eine Suppression von pathogenen T-Zellen und Makrophagen den Verlauf der Arthritis supprimieren. An diesem Mechanismus könnten IL-10 und/oder TGF-β beteiligt sein. Der Transfer von T_{reg}-Zellen in die etablierte AIA hat keinen Effekt, weil ihre arthritissupprimierende Fähigkeit möglicherweise durch hohe Level von IL-6 oder die Expression von GITR-Ligand auf aktivierten Makrophagen blockiert wird.

Denkbar wäre auch, dass die adoptiv transferierten T_{reg}-Zellen mit der Aktivierung der mBSA-reaktiven T-Zellen im Lymphknoten interferieren und so deren Migration in das Gelenk und damit die Entstehung einer chronischen Arthritis verhindern. Wenn die T_{reg}-Zellen nach der AIA-Induktion transferiert werden, kann es somit sein, dass sie diese Aktivierung der pathogenen T-Zellen nicht mehr verhindern können, weil diese bereits abgelaufen ist. Allerdings zeigen aktuell publizierte Daten, dass T_{reg}-Zellen nicht die initiale T-Zell-Aktivierung, sondern deren Expansion zu späteren Zeitpunkten inhibieren (Klein et al 2003).

Es kann derzeit nur vermutet werden, welche molekularen Mechanismen letztendlich an der regulatorischen Aktivität von T_{reg}-Zellen *in vivo* beteiligt sind. Im Modell der SCID-Kolitis konnte der suppressive Effekt von T_{reg}-Zellen durch die Gabe von anti-IL-10-Rezeptor-, anti-TGF-β- und auch anti-CTLA-4-mAk beseitigt werden (Read et al. 2000, Suri-Payer und Cantor 2001, Liu et al. 2003). Da durch die Behandlung mit Antikörpern auch die endogen produzierten Zytokine neutralisiert werden und die Gabe von anti-CTLA-4 oder anti-IL-10 allein ausreichend ist, in den behandelten Tieren Autoimmunphänomene zu erzeugen, ist ein solcher experimenteller Ansatz in

der AIA für die Klärung dieser Frage unzureichend (Takahashi et al. 2000, Asseman et al. 2003). Um eine Beteiligung dieser Moleküle an der T_{reg} -Funktion in der AIA zu untersuchen, müssten Zellen transferiert werden, die defizient für diese Moleküle sind. Hierzu könnten T_{reg} -Zellen aus knockout-Tieren zum Einsatz kommen, was allerdings nur im Falle des IL-10 möglich ist, da TGF- β - oder CTLA-4-knockout-Mäuse auf dem C57Bl/6-Hintergrund intrauterin oder wenige Wochen nach der Geburt versterben. Ein möglicher Weg wäre die Verwendung von Tieren, deren T-Zellen nicht TGF- β -responsibel sind, als Rezipienten der T_{reg} -Zellen oder das gezielte Ausschalten der in Frage kommenden Genprodukte durch RNA-Interferenz.

Zusammenfassung

Regulatorische T-Zellen, die durch die Expression des Integrins $\alpha_E\beta_7$ charakterisiert sind können die AIA besser supprimieren, als T_{reg} -Zellen, die dieses Molekül nicht exprimieren. Diese arthritissupprimierende Fähigkeit korreliert mit ihrer Eigenschaft, direkt in das entzündete Gewebe einwandern zu können. Daher lässt sich vermuten, dass die Suppression der Arthritis direkt im entzündeten Gewebe besonders effizient ist.

5.5 Regulatorische T-Zellen und Autoimmunerkrankungen des Menschen

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen, besonders aber $\alpha_E\beta_7$ -exprimierende Subpopulationen dieser Zellen, über eine Beeinflussung der komplexen zellulären Interaktionen eine wichtige modulatorische Rolle in der Pathogenese der chronischen Arthritis spielen. Die beeindruckenden Folgen der Depletion oder des Transfers solcher Zellen legen nahe, dass sie ein wesentliches Regulationssystem der Arthritis darstellen. Man muss davon ausgehen, dass nicht nur die Balance zwischen T_H1 - und T_H2 -Antworten entscheidend für Suszeptibilität und Ausprägung der Arthritis sind, sondern T_{reg} -Zellen hieran wesentlich beteiligt sind.

Weil $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen auch im Menschen existieren und die gleichen phänotypischen und funktionellen Eigenschaften wie Maus- T_{reg} -Zellen aufweisen, ist es denkbar, dass eine quantitative oder qualitative Beeinträchtigung dieses Zellsystems das Auftreten von Autoimmunerkrankungen ermöglicht (Baecher-Allan et al. 2001, Dieckmann et al. 2001, Jonuleit et al. 2001). Diese Beeinträchtigung könnte von genetischen Faktoren und/oder Umwelteinflüssen (z.B. Infektionen) abhängig

sein. Solch ein Zusammenhang zwischen genetischer Prädisposition und Virusinfektion ist bereits im Rattenmodell beschrieben worden: Die Infektion von suszeptiblen BBDR-Ratten, aber nicht von WF-Ratten, mit Kilhams Rat Virus führt zu einer Abnahme der CD4⁺CD25⁺ Zellen in der Milz und zum Auftreten von Diabetes (Zipris et al. 2003).

Im Humansystem ist im Falle des Typ-1-Diabetes, der häufig mit viralen Infektionen in Verbindung gebracht wird, in Patienten mit frisch diagnostizierter Krankheit eine Verringerung der Anzahl der peripheren CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen gefunden worden (Kukreja et al. 2002). Bei anderen Autoimmunerkrankungen des Menschen ist die Situation weniger eindeutig. Im Falle des klinisch aktiven SLE ist die Anzahl der T_{reg}-Zellen im peripheren Blut erniedrigt (Crispin et al. 2003, Liu et al. 2004). Andere Autoren fanden eine normale Anzahl von T_{reg}-Zellen in SLE-Patienten mit aktiver Erkrankung, während in Patienten mit inaktivem SLE die Anzahl der T_{reg}-Zellen erhöht war. Allerdings waren die T_{reg}-Zellen aus Patienten mit aktivem SLE nicht in der Lage, die Suppression von CD4⁺CD25⁻ Zellen zu hemmen (Valencia et al. 2003).

Auch bei der Multiplen Sklerose (MS) sind die bisher publizierten Daten widersprüchlich. Während Putheti et al. (2004) keine Beeinträchtigung von CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen in MS-Patienten fanden, beschrieb die Gruppe von Hafler eine beeinträchtigte Funktion von CD4⁺CD25⁺ Zellen in diesen Patienten (Viglietta et al. 2004).

Im Falle der RA ist von Cao et al. (2003) eine Akkumulation von CD4⁺CD25⁺ Zellen direkt in der Synovialflüssigkeit der entzündeten Gelenke gezeigt worden. Diese Zellen sind *in vitro* auch funktionell T_{reg}-Zellen, da sie in der Lage waren, CD4⁺CD25⁻ Zellen aus der SF oder dem peripheren Blut im Kokulturrassay zu inhibieren (Cao et al. 2003). In einer anderen Arbeit wurde auch eine Anreicherung von T_{reg}-Zellen mit gesteigerter Suppressionskapazität beschrieben (van Amelsfort et al. 2003). Diese Ansammlung von T_{reg}-Zellen im RA-Gelenk bestätigt die experimentellen Befunde aus der hier vorgelegten Arbeit bezüglich einer Anreicherung in entzündeten Geweben. Offen bleibt, warum trotz einer Anreicherung von T_{reg}-Zellen im RA-Gelenk Entzündung und Gelenkdestruktion nicht gestoppt werden. Hierfür gibt es verschiedene Möglichkeiten:

- Die Anreicherung von T_{reg}-Zellen ist nicht ausreichend für eine suffiziente Suppression der RA

- Es findet eine Suppression statt, die die Entzündung und damit die Gelenkdestruktion verlangsamt und damit den Verlauf der RA verzögert (es könnte also spekuliert werden, dass eine Depletion von T_{reg} -Zellen zu einem rascheren Fortschreiten der Erkrankung führen würde)
- Die T_{reg} -Zellen sind zwar im Gelenk vorhanden, aber funktionell inaktiviert

Insbesondere die letzte Möglichkeit besitzt eine gewisse Attraktivität auch in Bezug auf die Ergebnisse der hier dargestellten Experimente, bei denen der Transfer von $CD4^+CD25^+$ Zellen in Tiere mit AIA keinen therapeutischen Effekt hatte. Im Humansystem ist gezeigt worden, dass die Zugabe von Synovialflüssigkeit aus RA-Gelenken zur Kokultur aus $CD4^+CD25^+$ und $CD4^+CD25^-$ Zellen aus RA-Gelenken die Proliferationshemmung aufheben kann (V. Malmström, persönliche Mitteilung). Verantwortlich hierfür könnte wiederum IL-6 sein, das in großen Mengen in der SF vorkommt und von dem bekannt ist, dass es die suppressive Wirkung von T_{reg} -Zellen auf T-Zellen aufheben kann (Pasare und Medzhitov 2003).

Zusätzlich besteht auch ein Großteil des entzündlichen Infiltrates im RA-Gelenk aus aktivierten Makrophagen, die GITR-Ligand exprimieren könnte (Tone et al. 2003). Es ist also möglich, dass die angereicherten $CD4^+CD25^+$ Zellen im RA-Gelenk *in situ* funktionell inaktiviert sind, so wie dies auch bei der AIA zu vermuten ist.

Denkbar ist auch, dass ein möglicher Defekt der T_{reg} -Funktion bereits Jahre vor der klinisch manifesten Erkrankung an RA auftritt. Autoantikörper wie anti-CCP oder Rheumafaktor sind bereits Jahre vor der klinischen Manifestation der RA erhöht (Rantapaa-Dahlqvist et al. 2003). Da es im Tiermodell durch eine Depletion von $CD25^+$ Zellen zum Auftreten von Autoantikörpern kommt (Sakaguchi et al. 1995), ist es möglich, dass eine Verringerung der Funktion und/oder Anzahl von T_{reg} -Zellen auch für diese Autoantikörperbildung und damit immunkomplexvermittelte frühe Pathogeneseschritte der RA im Menschen verantwortlich ist.

Weil die Rolle von T_{reg} -Zellen in der Pathogenese der RA noch so unklar ist, kann über den Erfolg einer Therapie, die die Anzahl oder Funktion solcher Zellen erhöht, derzeit nur spekuliert werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass durch eine anti-TNF- α -Behandlung die Anzahl der T_{reg} -Zellen erhöht wird. Diese Erhöhung ist nur in den Patienten nachweisbar, in denen die anti-TNF- α -Therapie wirksam war (Ehrenstein et al. 2003). Auch im Maussystem (NOD-Maus) wurde eine Modulation

der T_{reg}-Zell-Zahl durch anti-TNF- α - oder TNF- α -Behandlung erreicht (Wu et al. 2002).

Der exakte molekulare Mechanismus der Suppression der T_{reg}-Zellen ist nicht bekannt. Daher kann ihre Funktion auch nicht direkt gemessen, sondern nur indirekt über ihre Fähigkeit zur Proliferationshemmung kokultivierter T-Zellen *in vitro* bestimmt werden. Da es auch keinen definitiven molekularen Marker dieser Zellen gibt, ist es möglich, dass CD4⁺CD25⁺ Zellen aus Patienten mit Autoimmunerkrankungen zusätzlich immer mit aktivierten (CD25⁺) T-Zellen kontaminiert sind. Dies kann die widersprüchlichen Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen bei der Charakterisierung der Rolle von T_{reg}-Zellen bei humanen Autoimmunerkrankungen erklären. Erst die genaue Kenntnis von Effektormechanismen und bessere molekulare Marker ermöglichen eindeutigere Aussagen über die Rolle von T_{reg}-Zellen bei Autoimmunerkrankungen und ihren Wert als Diagnose- oder Prognoseparameter sowie als Ziel therapeutischer Interventionen.

6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse der hier dargestellten Experimente zeigen, dass regulatorische T-Zellen eine wichtige protektive und modulierende Rolle in der Pathogenese der Antigen-induzierten Arthritis der Maus spielen. Die Depletion dieser Zellen *in vivo* führt über eine gesteigerte zelluläre Immunreaktivität zu einer verstärkten Arthritis. Der adoptive Transfer von regulatorischen T-Zellen zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion kann den Verlauf der AIA signifikant beeinflussen. Hierbei spielen vermutliche lokale Effekte im drainierenden Lymphknoten oder direkt im entzündeten Gewebe eine wesentliche Rolle. Somit eignet sich die AIA als nichtlymphopenisches Tiermodell zur Testung der Suppressionsfähigkeit von T_{reg}-Zellen, die bislang vorwiegend in lymphopenischen Tieren untersucht wurde.

Weiterhin zeigten diese Untersuchungen, dass T_{reg}-Zellen fähig sind, in entzündete Gebiete einzuwandern. Auch bei RA-Patienten findet offensichtlich eine solche Akkumulation von T_{reg}-Zellen im betroffenen Gelenk statt.

Der fehlende therapeutische Effekt von T_{reg}-Zellen in der etablierten Arthritis könnte ein Hinweis auf eine lokale Deaktivierung der Suppression unter entzündlichen Bedingungen sein. Sollte dies zutreffen, könnte dies erklären, warum es bei RA-Patienten trotz einer Akkumulation von T_{reg}-Zellen zu einer persistierenden Entzündung im Gelenk kommt. Da der genaue Effektormechanismus von T_{reg}-Zellen nicht bekannt ist, kann derzeit keine Aussage gemacht werden, ob eine solche funktionelle Beeinträchtigung dieser T-Zell-Subpopulation *in vivo* existiert.

Es ist daher wichtig, den oder die beteiligten Effektormechanismen zu identifizieren. Mögliche Kandidaten sind die immunsuppressiven Zytokine IL-10 und/oder TGF- β . Die Rolle von IL-10 kann durch den Transfer von T_{reg}-Zellen aus IL-10-defizienten Mäusen in Wildtyp-Rezipienten mit AIA untersucht werden. Eine mögliche Induktion einer IL-10-Produktion in Zellen des Rezipienten durch T_{reg}-Transfer ließe sich durch den Transfer von Wildtyp-T_{reg}-Zellen in IL-10-defiziente Rezipienten untersuchen.

Mit ähnlichen Ansätzen kann auch die Rolle von TGF- β untersucht werden. Die Verwendung von Mäusen mit einem T-Zell-spezifischen Defekt im TGF- β -Signaling (dnTGF- β RII-transgene Tiere) als Rezipienten für Wildtyp-T_{reg}-Zellen erlaubt Aussagen über eine Beteiligung dieses Zytokins am Regulationseffekt. Durch den Transfer von TGF- β -defizienten TZR-transgenen T-Zellen kann der Beitrag dieses

Zytokins für die T_{reg} -vermittelte Suppression direkt untersucht werden. Solche experimentellen Ansätze unter Verwendung von genetisch defizienten T_{reg} -Zellen in einem nichtlymphopenischen Entzündungsmodell werden erstmals definitive Aussagen über die Effektormechanismen von T_{reg} -Zellen möglich machen.

Ebenso interessant und wichtig ist eine detaillierte Untersuchung der dynamischen Interaktionen zwischen T_{reg} -Zellen, pathogen T-Zellen und APZ in den drainierenden Lymphorganen. Solche Untersuchungen können mittels Multiphotonenmikroskopie am lebenden Tier durchgeführt werden, wobei sich hierbei aufgrund des exakt bekannten Krankheitsbeginns wiederum die AIA als experimentelles System anbietet.

Die Erkenntnisse aus solchen Experimenten können einen wichtigen Beitrag zum genauen Verständnis der Funktionsweise von T_{reg} -Zellen und damit zur Entwicklung neuer Therapieansätze bei der RA und anderen Autoimmunerkrankungen beitragen.

7 Literaturverzeichnis

Aletaha D, Smolen JS (2002). Effectiveness profiles and dose dependent retention of traditional disease modifying antirheumatic drugs for rheumatoid arthritis. An observational study. *J Rheumatol* 29, 1631-1638.

Almeida AR, Legrand N, Papiernik M, Freitas AA (2002). Homeostasis of peripheral CD4⁽⁺⁾ T cells: IL-2R α and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4⁽⁺⁾ T cell numbers. *J Immunol* 169, 4850-4860.

Anastasi E, Campese AF, Bellavia D, Bulotta A, Balestri A, Pascucci M, Checquolo S, Gradini R, Lendahl U, Frati L, *et al.* (2003). Expression of activated Notch3 in transgenic mice enhances generation of T regulatory cells and protects against experimental autoimmune diabetes. *J Immunol* 171, 4504-4511.

Annacker O, Pimenta-Araujo R, Buren-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A (2001). CD25⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* 166, 3008-3018.

Antov A, Yang L, Vig M, Baltimore D, Van Parijs L (2003). Essential role for STAT5 signaling in CD25⁺CD4⁺ regulatory T cell homeostasis and the maintenance of self-tolerance. *J Immunol* 171, 3435-3441.

Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H (2002). Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3, 756-763.

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, *et al.* (1988). The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31, 315-324.

Aseffa A, Gummy A, Launois P, MacDonald HR, Louis JA, Tacchini-Cottier F (2002). The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *J Immunol* 169, 3232-3241.

Asseman C, Read S, Powrie F (2003). Colitogenic Th1 cells are present in the antigen-experienced T cell pool in normal mice: control by CD4⁺ regulatory T cells and IL-10. *J Immunol* 171, 971-978.

Austrup F, Vestweber D, Borges E, Löhning M, Bräuer R, Herz U, Renz H, Hallmann R, Scheffold A, Radbruch A, Hamann A (1997). P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 385, 81-83.

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA (2001). CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167, 1245-1253.

Banerjee S, Wei BY, Hillman K, Luthra HS, David CS (1988). Immunosuppression of collagen-induced arthritis in mice with an anti-IL-2 receptor antibody. *J Immunol* 141, 1150-1154.

Banz A, Peixoto A, Pontoux C, Cordier C, Rocha B, Papiernik M (2003). A unique subpopulation of CD4⁺ regulatory T cells controls wasting disease, IL-10 secretion and T cell homeostasis. *Eur J Immunol* 33, 2419-2428.

Bardos T, Czipri M, Vermes C, Finnegan A, Mikecz K, Zhang J (2003). CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells may not be involved in controlling autoimmune arthritis. *Arthritis Res Ther* 5, R106-113

Barthlott T, Kassiotis G, Stockinger B (2003). T cell regulation as a side effect of homeostasis and competition. *J Exp Med* 197, 451-460.

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL (2002). CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420, 502-507.

Berner BR, Denking M, Rao RN, Anthony DD, Forsthuber T (2003). HLA-DRB*0404 transgene confers susceptibility to glucose-6-phosphat isomerase induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 48, S150.

Bluestone JA, Abbas AK (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3, 253-257.

Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR (1977a). Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 20, 841-850.

Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR (1977b). Studies on antigen-induced arthritis in mice. III. Cell and serum transfer experiments. *J Immunol* 118, 1645-1648.

Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR, Miller JF (1977c). Studies on antigen-induced arthritis in mice. II. Immunologic correlates of arthritis susceptibility in mice. *J Immunol* 118, 1639-1644.

Brand DD, Marion TN, Myers LK, Rosloniec EF, Watson WC, Stuart JM, Kang AH (1996). Autoantibodies to murine type II collagen in collagen-induced arthritis: a comparison of susceptible and nonsusceptible strains. *J Immunol* 157, 5178-5184.

Bräuer R, Kittlick PD, Thoss K, Henzgen S (1994). Different immunological mechanisms contribute to cartilage destruction in antigen-induced arthritis. *Exp Toxicol Pathol* 46, 383-388.

Bräuer R, Thoss K, Henzgen S (1993). Humoral and cell-mediated sensitivity to cartilage constituents in mice with antigen-induced arthritis. *Agents Actions Suppl* 39, 69-73.

Bräuer R, Thoss K, Henzgen S, Waldmann G (1988). Significance of cell-mediated and humoral immunity in the acute and chronic phase of antigen-induced arthritis in rabbits. *Exp Pathol* 34, 197-208.

Breban MA, Moreau MC, Fournier C, Ducluzeau R, Kahn MF (1993). Influence of the bacterial flora on collagen-induced arthritis in susceptible and resistant strains of rats. *Clin Exp Rheumatol* 11, 61-64.

Buchner E, Bräuer R, Schmidt C, Emmrich F, Kinne RW (1995). Induction of flare-up reactions in rat antigen-induced arthritis. *J Autoimmun* 8, 61-74.

Burger D (2000). Cell contact-mediated signaling of monocytes by stimulated T cells: a major pathway for cytokine induction. *Eur Cytokine Netw* 11, 346-353.

Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG (2001). B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol* 2, 1126-1132.

- Camara NO, Ng WF, Hernandez-Fuentes M, Eren E, Lechler RI (2002). Human CD4⁺ CD25⁺ T cells regulate CD8⁺ T-cell activation. *Transplant Proc* 34, 2858-2860.
- Cao D, Malmström V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C (2003). Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from target organs of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 33, 215-223.
- Chai JG, Tsang JY, Lechler R, Simpson E, Dyson J, Scott D (2002). CD4⁺CD25⁺ T cells as immunoregulatory T cells in vitro. *Eur J Immunol* 32, 2365-2375.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM (2003). Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor FoxP3. *J Exp Med* 198, 1875-1886.
- Choy EH, Isenberg DA, Garrood T, Farrow S, Ioannou Y, Bird H, Cheung N, Williams B, Hazleman B, Price R, *et al.* (2002). Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum* 46, 3143-3150.
- Cohen IR (1986). Regulation of autoimmune disease physiological and therapeutic. *Immunol Rev* 94, 5-21.
- Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL (2002). CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ Immunoregulatory T Cells: New Therapeutics for Graft-Versus-Host Disease. *J Exp Med* 196, 401-406.
- Corr M, Crain B (2002). The role of FcγR signaling in the K/B x N serum transfer model of arthritis. *J Immunol* 169, 6604-6609.
- Crispin JC, Martinez A, Alcocer-Varela J (2003). Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 21, 273-276.
- D'Ambrosio D, Sinigaglia F, Adorini L (2003). Special attractions for suppressor T cells. *Trends Immunol* 24, 122-126.

Davies JD, O'Connor E, Hall D, Krah T, Trotter J, Sarvetnick N (1999). CD4⁺ CD45RB low-density cells from untreated mice prevent acute allograft rejection. *J Immunol* 163, 5353-5357.

de la Rosa M, Rutz S, Scheffold A (2003). Competition for IL-2 is essential for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Immunobiology* 208, S79.

De Vita S, Zaja F, Sacco S, De Candia A, Fanin R, Ferraccioli G (2002). Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogenetic role of B cells. *Arthritis Rheum* 46, 2029-2033.

Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G (2002). Human CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. *J Exp Med* 196, 247-253.

Dieckmann D, Plottnner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193, 1303-1310.

Dumonde DC, Glynn LE (1962). The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br J Exp Pathol* 43, 373-383.

Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Isenberg DA, Mauri C (2003). Expansion of regulatory (CD4⁺CD25^{hi}) T lymphocytes in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis who respond to anti-TNF-therapy. *Arthritis Rheum* 48, S240.

Ermann J, Szanya V, Ford GS, Paragas V, Fathman CG, Lejon K (2001). Cd4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ t cells facilitate the induction of T cell anergy. *J Immunol* 167, 4271-4275.

Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 1206-1212.

Feunou P, Poulin L, Habran C, Le Moine A, Goldman M, Braun MY (2003). CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells act respectively as inducer and effector T suppressor cells in superantigen-induced tolerance. *J Immunol* 171, 3475-3484.

Fischer M, Modder G (2002). Radionuclide therapy of inflammatory joint diseases. *Nucl Med Commun* 23, 829-831.

Fisson S, Darrasse-Jeze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, Salomon BL (2003). Continuous activation of autoreactive CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med* 198, 737-746.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330-336.

Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ (2002). Interleukin 2 signaling is required for CD4⁽⁺⁾ regulatory T cell function. *J Exp Med* 196, 851-857.

Gabriel SE, Coyle D, Moreland LW (2001). A clinical and economic review of disease-modifying antirheumatic drugs. *Pharmacoeconomics* 19, 715-728.

Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM, Doran MF, Turesson C, O'Fallon WM, Matteson EL (2003). Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis Rheum* 48, 54-58.

Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A (2002). Homeostasis and anergy of CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 3, 33-41.

Gershon RK, Kondo K (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21, 903-914

Glant TT, Bardos T, Vermes C, Chandrasekaran R, Valdez JC, Otto JM, Gerard D, Velins S, Lovasz G, Zhang J, *et al.* (2001). Variations in susceptibility to proteoglycan-induced arthritis and spondylitis among C3H substrains of mice: evidence of genetically acquired resistance to autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 44, 682-692.

Glant TT, Finnegan A, Mikecz K (2003). Proteoglycan-induced arthritis: immune regulation, cellular mechanisms, and genetics. *Crit Rev Immunol* 23, 199-250.

Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Hajeer AH (2002). Influence of human leukocyte antigen-DRB1 on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 31, 355-360.

Graca L, Cobbold SP, Waldmann H (2002a). Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med* 195, 1641-1646.

Graca L, Thompson S, Lin CY, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H (2002b). Both CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ and CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁻⁾ regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J Immunol* 168, 5558-5565.

Green EA, Choi Y, Flavell RA (2002). Pancreatic lymph node-derived CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. *Immunity* 16, 183-191.

Green EA, Gorelik L, McGregor CM, Tran EH, Flavell RA (2003). CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells control anti-islet CD8⁺ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10878-10883.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG (1997). A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742.

Grundstrom S, Cederbom L, Sundstedt A, Scheipers P, Ivars F (2003). Superantigen-induced regulatory T cells display different suppressive functions in the presence or absence of natural CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in vivo. *J Immunol* 170, 5008-5017.

Gumpel JM, Stevenson AC (1975). Chromosomal damage after intra-articular injection of different colloids of yttrium 90. *Rheumatol Rehabil* 14, 7-12.

Hansch A, Sauner D, Hilger I, Frey O, Haas M, Malich A, Bräuer R, Kaiser WA (2003). Noninvasive diagnosis of arthritis by autofluorescence. *Invest Radiol* 38, 578-583.

Hansch A, Frey O, Sauner D, Hilger I, Haas M, Malich A, Bräuer R, Kaiser WA (2004). In vivo imaging of experimental arthritis with near-infrared fluorescence. *Arthritis Rheum* 50, 961-967.

Hara M, Kingsley CI, Niimi M, Read S, Turvey SE, Bushell AR, Morris PJ, Powrie F, Wood KJ (2001). IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol* 166, 3789-3796.

Hazenbergh MD, Verschuren MC, Hamann D, Miedema F, van Dongen JJ (2001). T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med* 79, 631-640.

Hersmann GH, Kriegsmann J, Simon J, Hüttich C, Bräuer R (1998). Expression of cell adhesion molecules and cytokines in murine antigen-induced arthritis. *Cell Adhes Commun* 6, 69-82.

Herve CA, Wait R, Venables PJ (2003). Glucose-6-phosphate isomerase is not a specific autoantigen in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 42, 986-988.

Highton J, Guevremont D, Thomson J, Carlisle B, Tucker I (1999). A trial of clodronate-liposomes as anti-macrophage treatment in a sheep model of arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 17, 43-48.

Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, Kishihara K, Tsukumo S, Yasutomo K (2004). Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells. *Nat Med* 10, 29-30.

Hochberg MC (2002). New directions in symptomatic therapy for patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 32, 4-14.

Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S (2002). Donor-type CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ Regulatory T Cells Suppress Lethal Acute Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *J Exp Med* 196, 389-399.

Hori S, Carvalho TL, Demengeot J (2002a). CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells suppress CD4⁺ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *Eur J Immunol* 32, 1282-1291.

Hori S, Haury M, Lafaille JJ, Demengeot J, Coutinho A (2002b). Peripheral expansion of thymus-derived regulatory cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Eur J Immunol* 32, 3729-3735.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.

Hoyne GF, Dallman MJ, Lamb JR (1999). Linked suppression in peripheral T cell tolerance to the house dust mite derived allergen Der p 1. *Int Arch Allergy Immunol* 118, 122-124.

Hoyne GF, Le Roux I, Corsin-Jimenez M, Tan K, Dunne J, Forsyth LM, Dallman MJ, Owen MJ, Ish-Horowicz D, Lamb JR (2000). Serrate1-induced notch signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral CD4⁽⁺⁾ T cells. *Int Immunol* 12, 177-185.

Hückel M (2003). Interaktionen zwischen T-Helfer-Zellen und Synoviozyten im experimentellen Arthritismodell. Dissertation, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Huehn J, Siegmund K, Lehmann J, Siewert C, Haubold U, Feuerer M, Debes G, Lauber J, Frey O, Przybilsky G, de la Rosa M, Schmidt C, Bräuer R, Buer J, Scheffold A, Hamann A (2004). Developmental stage, phenotype and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4⁺ regulatory T cells. *J Exp Med* 199, 303-313.

Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, D'Ambrosio D (2001). Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells. *J Exp Med* 194, 847-853.

Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 162, 5317-5326.

Ji H, Ohmura K, Mahmood U, Lee DM, Hofhuis FM, Boackle SA, Takahashi K, Holers VM, Walport M, Gerard C, *et al.* (2002). Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* 16, 157-168.

- Johnson JG, Jenkins MK (1994). The role of anergy in peripheral T cell unresponsiveness. *Life Sci* 55, 1767-1780.
- Jones LA, Chin LT, Longo DL, Kruisbeek AM (1990). Peripheral clonal elimination of functional T cells. *Science* 250, 1726-1729.
- Jones E, Dahm-Vicker M, Simon AK, Green A, Powrie F, Cerundolo V, Gallimore A (2002). Depletion of CD25⁺ regulatory cells results in suppression of melanoma growth and induction of autoreactivity in mice. *Cancer Immun* 2, 1.
- Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH (2002). Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 196, 255-260.
- Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH (2001). Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193, 1285-1294.
- Karim M, Kingsley CI, Bushell AR, Sawitzki BS, Wood KJ (2004). Alloantigen-induced CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells can develop in vivo from CD25⁻CD4⁺ precursors in a thymus-independent process. *J Immunol* 172, 923-928.
- Kawahata K, Misaki Y, Yamauchi M, Tsunekawa S, Setoguchi K, Miyazaki J, Yamamoto K (2002). Generation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *J Immunol* 168, 4399-4405.
- Keystone EC, Schorlemmer HU, Pope C, Allison AC (1977). Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. *Arthritis Rheum* 20, 1396-1401.
- Khatti R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F (2003). An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4, 337-342.
- Kimpel D, Dayton T, Kannan K, Wolf RE (2002). Streptococcal cell wall arthritis: kinetics of immune cell activation in inflammatory arthritis. *Clin Immunol* 105, 351-362.

- Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ (2002). CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 168, 1080-1086.
- Kinne RW, Bräuer R, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR (2000). Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2, 189-202.
- Klein L, Khazaie K, von Boehmer H (2003). In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8886-8891.
- Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD (2002). Cutting edge: CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 169, 4712-4716.
- Koopman WJ, Gay S (1988). The MRL-lpr/lpr mouse. A model for the study of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol Suppl* 75, 284-289.
- Kramer I, Wibulswas A, Croft D, Genot E (2003). Rheumatoid arthritis: targeting the proliferative fibroblasts. *Prog Cell Cycle Res* 5, 59-70.
- Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, *et al.* (2002). Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 109, 131-140.
- Kullberg MC, Jankovic D, Gorelick PL, Caspar P, Letterio JJ, Cheever AW, Sher A (2002). Bacteria-triggered CD4⁽⁺⁾ T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis. *J Exp Med* 196, 505-515.
- Kumanogoh A, Wang X, Lee I, Watanabe C, Kamanaka M, Shi W, Yoshida K, Sato T, Habu S, Itoh M, *et al.* (2001). Increased T cell autoreactivity in the absence of CD40-CD40 ligand interactions: a role of CD40 in regulatory T cell development. *J Immunol* 166, 353-360.
- Kuniyasu Y, Takahashi T, Itoh M, Shimizu J, Toda G, Sakaguchi S (2000). Naturally anergic and suppressive CD25⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾ T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int Immunol* 12, 1145-1155.

- Kursar M, Bonhagen K, Fensterle J, Kohler A, Hurwitz R, Kamradt T, Kaufmann SH, Mittrucker HW (2002). Regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells restrict memory CD8⁺ T cell responses. *J Exp Med* 196, 1585-1592.
- Kyburz D, Corr M (2003). The KRN mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 25, 79-90.
- Lavelle EC, McNeela E, Armstrong ME, Leavy O, Higgins SC, Mills KH (2003). Cholera toxin promotes the induction of regulatory T cells specific for bystander antigens by modulating dendritic cell activation. *J Immunol* 171, 2384-2392.
- Lehmann I (2002). Interaktionen zwischen T-Zellen und Makrophagen bei der experimentellen Arthritis. Diplomarbeit, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, Maszyra F, Kretschmer U, Krenn V, Brunner M, Scheffold A, Hamann A (2002). Expression of the integrin alphaE beta7 identifies unique subsets of CD25⁺ as well as CD25⁻ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13031-13036.
- Lenardo MJ (1991). Interleukin-2 programs mouse alpha beta lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353, 858-861.
- Lens JW, van den Berg WB, van de Putte LB, Zwarts WA (1986). Flare of antigen-induced arthritis in mice after intravenous challenge. Kinetics of antigen in the circulation and localization of antigen in the arthritic and noninflamed joint. *Arthritis Rheum* 29, 665-674.
- Lepault F, Gagnerault MC (2000). Characterization of peripheral regulatory CD4⁺ T cells that prevent diabetes onset in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 164, 240-247.
- Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG (2001). Human CD25(+)CD4(+) T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 193, 1295-1302.
- Li P, Schwarz EM (2003). The TNF-alpha transgenic mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 25, 19-33.

- Liu H, Hu B, Xu D, Liew FY (2003). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta, and CTLA4. *J Immunol* 171, 5012-5017.
- Liu MF, Wang CR, Fung LL, Wu CR (2004). Decreased CD4⁺CD25⁺ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 59, 198-202.
- Liu Z, Geboes K, Hellings P, Maerten P, Heremans H, Vandenberghe P, Boon L, van Kooten P, Rutgeerts P, Ceuppens JL (2001). B7 interactions with CD28 and CTLA-4 control tolerance or induction of mucosal inflammation in chronic experimental colitis. *J Immunol* 167, 1830-1838.
- Luross JA, Williams NA (2001). The genetic and immunopathological processes underlying collagen-induced arthritis. *Immunology* 103, 407-416.
- Luross JA, Heaton T, Hirst TR, Day MJ, Williams NA (2002). Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit prevents autoimmune arthritis through induction of regulatory CD4⁺ T cells. *Arthritis Rheum* 46, 1671-1682.
- Maccioni M, Zeder-Lutz G, Huang H, Ebel C, Gerber P, Hergueux J, Marchal P, Duchatelle V, Degott C, van Regenmortel M, *et al.* (2002). Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice. *J Exp Med* 195, 1071-1077.
- Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L (2002). CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 17, 167-178.
- Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ, Powrie F (2003). CD4⁺CD25⁺ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 197, 111-119.
- Martin E, O'Sullivan B, Low P, Thomas R (2003). Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *Immunity* 18, 155-167.
- Matthys P, Vermeire K, Heremans H, Billiau A (2000). The protective effect of IFN-gamma in experimental autoimmune diseases: a central role of mycobacterial adjuvant-induced myelopoiesis. *J Leukoc Biol* 68, 447-454.

- McGuirk P, McCann C, Mills KH (2002). Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med* 195, 221-231.
- McHugh RS, Shevach EM (2002). Cutting edge: depletion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is necessary, but not sufficient, for induction of organ-specific autoimmune disease. *J Immunol* 168, 5979-5983.
- McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC (2002). CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16, 311-323.
- McInnes IB, Gracie JA, Harnett M, Harnett W, Liew FY (2003). New strategies to control inflammatory synovitis: interleukin 15 and beyond. *Ann Rheum Dis* 62 Suppl 2, ii51-54.
- McInnes IB, Leung BP, Liew FY (2000). Cell-cell interactions in synovitis. Interactions between T lymphocytes and synovial cells. *Arthritis Res* 2, 374-378.
- Menges M, Rossner S, Voigtlander C, Schindler H, Kukutsch NA, Bogdan C, Erb K, Schuler G, Lutz MB (2002). Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* 195, 15-21.
- Mentzel K, Bräuer R (1998). Matrix metalloproteinases, IL-6, and nitric oxide in rat antigen-induced arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 16, 269-276.
- Michaud K, Messer J, Choi HK, Wolfe F (2003). Direct medical costs and their predictors in patients with rheumatoid arthritis: a three-year study of 7,527 patients. *Arthritis Rheum* 48, 2750-2762.
- Montagnoli C, Bacci A, Bozza S, Gaziano R, Mosci P, Sharpe AH, Romani L (2002). B7/CD28-dependent CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. *J Immunol* 169, 6298-6308.

Morgan ME, Suttmüller RP, Witteveen HJ, van Duivenvoorde LM, Zanelli E, Melief CJ, Snijders A, Offringa R, de Vries RR, Toes RE (2003). CD25⁺ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 48, 1452-1460.

Morrissey PJ, Charrier K (1994). Induction of wasting disease in SCID mice by the transfer of normal CD4⁺/CD45RB^{hi} T cells and the regulation of this autoreactivity by CD4⁺/CD45RB^{lo} T cells. *Res Immunol* 145, 357-362.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-57.

Mottet C, Uhlig HH, Powrie F (2003). Cutting edge: cure of colitis by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 170, 3939-3943.

Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S (1998). Retroviral sequences in rheumatoid arthritis synovium. *Int Rev Immunol* 17, 273-290.

Murakami M, Sakamoto A, Bender J, Kappler J, Marrack P (2002). CD25⁺CD4⁺ T cells contribute to the control of memory CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8832-8837.

Nakamura H, Nagashima M, Ishigami S, Wauke K, Yoshino S (2000). The anti-rheumatic effect of multiple synovectomy in patients with refractory rheumatoid arthritis. *Int Orthop* 24, 242-245.

Nakamura K, Kitani A, Strober W (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194, 629-644.

Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, Strober W (2004). TGF-beta1 plays an important role in the mechanism of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* 172, 834-42.

Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD, Isaacs JD, Lechler RI (2001). Human CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 98, 2736-2744.

Noel C, Florquin S, Goldman M, Braun MY (2001). Chronic exposure to superantigen induces regulatory CD4⁽⁺⁾ T cells with IL-10-mediated suppressive activity. *Int Immunol* 13, 431-439.

Oida T, Zhang X, Goto M, Hachimura S, Totsuka M, Kaminogawa S, Weiner HL (2003). CD4⁺CD25⁻ T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4⁺CD45RB^{high}-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism. *J Immunol* 170, 2516-2522.

Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 59, 3128-3133.

Paleolog E (2003). The therapeutic potential of TNF-alpha blockade in rheumatoid arthritis. *Expert Opin Investig Drugs* 12, 1087-1095.

Papiernik M, de Moraes ML, Pontoux C, Vasseur F, Penit C (1998). Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol* 10, 371-378.

Pasare C, Medzhitov R (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299, 1033-1036.

Peng Y, Laouar Y, Li MO, Green EA, Flavell RA (2004). TGF-(beta) regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells responsible for protection of diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4572-4577.

Petrow PK, Thoss K, Henzgen S, Katenkamp D, Bräuer R (1996a). Limiting dilution analysis of the frequency of autoreactive lymph node cells isolated from mice with antigen-induced arthritis. *J Autoimmun* 9, 629-635.

Petrow PK, Thoss K, Katenkamp D, Bräuer R (1996b). Adoptive transfer of susceptibility to antigen-induced arthritis into severe combined immunodeficient (SCID) mice: role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Immunol Invest* 25, 341-353.

Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, Shevach EM (2002). CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ Regulatory T Cells Can Mediate Suppressor

Function in the Absence of Transforming Growth Factor beta1 Production and Responsiveness. *J Exp Med* 196, 237-246.

Piccirillo CA, Shevach EM (2001). Cutting edge: control of CD8⁺ T cell activation by CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory cells. *J Immunol* 167, 1137-1140.

Pohlers D, Nissler K, Frey O, Simon J, Petrow PK, Kinne RW, Bräuer R (2004). Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: Influence on T helper cell activation. *Clin Exp Immunol* 135, 409-415.

Pontoux C, Banz A, Papiernik M (2002). Natural CD4⁽⁺⁾ CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells control the burst of superantigen-induced cytokine production: the role of IL-10. *Int Immunol* 14, 233-239.

Powrie F, Leach MW (1995). Genetic and spontaneous models of inflammatory bowel disease in rodents: evidence for abnormalities in mucosal immune regulation. *Ther Immunol* 2, 115-123.

Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL (1993). Phenotypically distinct subsets of CD4⁺ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 5, 1461-1471.

Putheti P, Petterson A, Soderstrom M, Link H, Huang YM (2004). Circulating CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs. *J Clin Immunol* 24, 155-161.

Raghavan S, Fredriksson M, Svennerholm AM, Holmgren J, Suri-Payer E (2003). Absence of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is associated with a loss of regulation leading to increased pathology in *Helicobacter pylori*-infected mice. *Clin Exp Immunol* 132, 393-400.

Ranganath S, Ouyang W, Bhattarcharya D, Sha WC, Grupe A, Peltz G, Murphy KM (1998). Gata-3-dependent enhancer activity in IL-4 gene regulation. *J Immunol* 161, 3822-3826.

Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij WJ (2003). Antibodies against cyclic citrullinated peptide and

IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48, 2741-2749.

Read S, Malmstrom V, Powrie F (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192, 295-302.

Romagnoli P, Hudrisier D, van Meerwijk JP (2002). Preferential recognition of self antigens despite normal thymic deletion of CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells. *J Immunol* 168, 1644-1648.

Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihama T, Matsutani T, Negishi I, Nakatsuru S, Sakaguchi S (2003). Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* 426, 454-460.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.

Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12, 431-440.

Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712

Sato K, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T (2003). Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. *Immunity* 18, 367-379.

Schubert D, Schmidt M, Zaiss D, Jungblut PR, Kamradt T (2002). Autoantibodies to GPI and creatine kinase in RA. *Nat Immunol* 3, 411; author reply 412-413.

Schubert D, Maier B, Morawietz L, Krenn V, Kamradt T (2004). Immunization with the glycolytic enzyme glucose-6-phosphate isomerase (GPI) induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice. *J Immunol* 172, 4503-4509.

Setoguchi K, Misaki Y, Araki Y, Fujio K, Kawahata K, Kitamura T, Yamamoto K (2000). Antigen-specific T cells transduced with IL-10 ameliorate experimentally induced arthritis without impairing the systemic immune response to the antigen. *J Immunol* 165, 5980-5986.

Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S (2002). Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3, 135-142.

Shimizu J, Moriizumi E (2003). Aging-dependent generation of suppressive CD4⁺CD25⁺R123^{lo}CD103⁺ T cells in mice. *Eur J Immunol* 33, 2449-2458.

Simon J (2000). Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von T-Helfer-Zellen bei der Antigen-induzierten Arthritis. Dissertation, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Simon J, Surber R, Kleinstaub G, Petrow PK, Henzgen S, Kinne RW, Bräuer R (2001). Systemic macrophage activation in locally-induced experimental arthritis. *J Autoimmun* 17, 127-136.

Stephens LA, Mason D (2000). CD25 is a marker for CD4⁺ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25⁺ and CD25⁻ subpopulations. *J Immunol* 165, 3105-3110.

Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F (2001). Human CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* 31, 1247-1254.

Stockinger B (1999). T lymphocyte tolerance: from thymocyte deletion to peripheral control mechanisms. *Adv Immunol* 71: 229-265.

Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM (1998). CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 160, 1212-1218.

Suri-Payer E, Cantor H (2001). Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells. *J Autoimmun* 16, 115-123.

Sutmoller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, Toes RE, Offringa R, Melief CJ (2001). Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 194, 823-832.

Suto A, Nakajima H, Ikeda K, Kubo S, Nakayama T, Taniguchi M, Saito Y, Iwamoto I (2002). CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T-cell development is regulated by at least 2 distinct mechanisms. *Blood* 99, 555-560.

Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT (2003). CD4⁺CD25⁺ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8⁺ T cell responses. *J Exp Med* 198, 889-901.

Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-69

Szanya V, Ermann J, Taylor C, Holness C, Fathman CG (2002). The subpopulation of CD4⁺CD25⁺ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J Immunol* 169, 2461-2465.

Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10, 1969-1980.

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192, 303-310.

Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK, Tooley AJ, Ye J, Subudhi SK, Zheng XX, Strom TB, Bluestone JA (2003). Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 171, 3348-3352.

Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR (2001). CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med* 193, 1311-1318.

Tehranzadeh J, Ashikyan O, Dascalos J (2003). Magnetic resonance imaging in early detection of rheumatoid arthritis. *Semin Musculoskelet Radiol* 7, 79-94.

Thornton AM, Shevach EM (1998). CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188, 287-296.

Thornton AM, Shevach EM (2000). Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 164, 183-190.

Thorstenson KM, Khoruts A (2001). Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25⁺CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J Immunol* 167, 188-195.

Tietz W, Hamann A (1997). The migratory behavior of murine CD4⁺ cells of memory phenotype. *Eur J Immunol* 27, 2225-2232.

Tone M, Tone Y, Adams E, Yates SF, Frewin MR, Cobbold SP, Waldmann H (2003). Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15059-15064.

Trani J, Moore DJ, Jarrett BP, Markmann JW, Lee MK, Singer A, Lian MM, Tran B, Caton AJ, Markmann JF (2003). CD25⁺ immunoregulatory CD4 T cells mediate acquired central transplantation tolerance. *J Immunol* 170, 279-286.

Unger WW, Hauet-Broere F, Jansen W, van Berkel LA, Kraal G, Samsom JN (2003a). Early events in peripheral regulatory T cell induction via the nasal mucosa. *J Immunol* 171, 4592-4603.

Unger WW, Jansen W, Wolvers DA, van Halteren AG, Kraal G, Samsom JN (2003b). Nasal tolerance induces antigen-specific CD4⁺CD25⁻ regulatory T cells that can transfer their regulatory capacity to naive CD4⁺ T cells. *Int Immunol* 15, 731-739.

- Uraushihara K, Kanai T, Ko K, Totsuka T, Makita S, Iiyama R, Nakamura T, Watanabe M (2003). Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25⁺ and CD25⁻ CD4⁺ glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 171, 708-716.
- Valencia X, Olson D, He L, Illei G, Lipsky P (2003). CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 48, S194.
- van Amelsfort JMR, Jacobs KMG, Bijlsma JW, Taams LS, Lafeber FP (2003). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in Rheumatoid arthritis: Differences in presence, phenotype and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 48, S464.
- van Eden W, Waksman BH (2003). Immune regulation in adjuvant-induced arthritis: possible implications for innovative therapeutic strategies in arthritis. *Arthritis Rheum* 48, 1788-1796.
- van Everdingen AA, Siewertsz van Reesema DR, Jacobs JW, Bijlsma JW (2003). Low-dose glucocorticoids in early rheumatoid arthritis: discordant effects on bone mineral density and fractures? *Clin Exp Rheumatol* 21, 155-160.
- VanderBorghet A, Geusens P, Raus J, Stinissen P (2001). The autoimmune pathogenesis of rheumatoid arthritis: role of autoreactive T cells and new immunotherapies. *Semin Arthritis Rheum* 31, 160-175.
- Verburg RJ, Toes RE, Fibbe WE, Breedveld FC, van Laar JM (2002). High dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation for rheumatoid arthritis: a review. *Hum Immunol* 63, 627-637.
- Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler D (2004). Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199, 971-979.
- Vingsbo C, Sahlstrand P, Brun JG, Jonsson R, Saxne T, Holmdahl R (1996). Pristane-induced arthritis in rats: a new model for rheumatoid arthritis with a chronic disease course influenced by both major histocompatibility complex and non-major histocompatibility complex genes. *Am J Pathol* 149, 1675-1683.

- Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breitmayer JP, Cottrez F, Groux H (2003). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18, 605-617.
- Walker LS, Chodos A, Eggena M, Dooms H, Abbas AK (2003a). Antigen-dependent proliferation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in vivo. *J Exp Med* 198, 249-258.
- Walker MR, Kasprowicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF (2003b). Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells. *J Clin Invest* 112, 1437-1443.
- Wing K, Ekmark A, Karlsson H, Rudin A, Suri-Payer E (2002). Characterization of human CD25⁺ CD4⁺ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology* 106, 190-199.
- Wu AJ, Hua H, Munson SH, McDevitt HO (2002). Tumor necrosis factor-alpha regulation of CD4⁺CD25⁺ T cell levels in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12287-12292.
- Xu D, Liu H, Komai-Koma M, Campbell C, McSharry C, Alexander J, Liew FY (2003). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania major* infection, and colitis in mice. *J Immunol* 170, 394-399.
- Yamagiwa S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA (2001). A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* 166, 7282-7289.
- Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, Steinman RM (2003). Direct expansion of functional CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 198, 235-247.
- Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, Reddy J, Nazareno RF, Sakaguchi S, Kuchroo VK, Weiner HL (2004). IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int Immunol* 16, 249-56.
- Zipris D, Hillebrands JL, Welsh RM, Rozing J, Xie JX, Mordes JP, Greiner DL, Rossini AA (2003). Infections that induce autoimmune diabetes in BBDR rats modulate CD4⁺CD25⁺ T cell populations. *J Immunol* 170, 3592-3602.

8 Anhang

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum : 22.04.1975 in Erfurt

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Lebenslauf

September 1981-Juli 1990 Besuch der Polytechnischen Oberschule VII in Arnstadt

September 1990-Juni 1993 Besuch des Staatlichen Gymnasiums I in Arnstadt

Juli 1993-September 1994 Zivildienst am Kreiskrankenhaus Arnstadt

Oktober 1994-November 2000 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

- Famulatur am University Hospital of the West Indies, Kingston, Jamaica
- Wahlfach im Praktischen Jahr: Anästhesie
- Staatsexamensnote 2

April 2001-April 2003 Landesgraduierstipendium

- Dissertation am Institut für Pathologie der FSU Jena: Rolle von regulatorischen T-Zellen bei der experimentellen Arthritis

Seit April 2003 wissenschaftlicher Mitarbeiter/Doktorand am Institut für Pathologie der FSU Jena

Artikel in Zeitschriften mit Gutachtersystem

Hansch A, Sauner D, Hilger I, **Frey O**, Haas M, Malich A, Bräuer R, Kaiser WA (2003). Noninvasive diagnosis of arthritis by autofluorescence. *Invest Radiol* 38, 578-583.

Hansch A, **Frey O**, Sauner D, Hilger I, Haas M, Malich A, Bräuer R, Kaiser WA (2004). In vivo imaging of experimental arthritis with near-infrared fluorescence. *Arthritis Rheum* 50, 961-967.

Huehn J, Siegmund K, Lehmann J, Siewert C, Haubold U, Feuerer M, Debes G, Lauber J, **Frey O**, Przybilsky G, de la Rosa M, Schmidt C, Bräuer R, Buer J, Scheffold A, Hamann A (2004). Developmental stage, phenotype and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4⁺ regulatory T cells. *J Exp Med* 199, 303-313.

Pohlers D, Nissler K, **Frey O**, Simon J, Petrow PK, Kinne RW, Bräuer R (2004). Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: Influence on T helper cell activation. *Clin Exp Immunol* 135, 409-415.

Hansch A, Hilger I, **Frey O**, Sauner D, Bräuer R, Kaiser WA (2004). Autofluorescence spectroscopy in whole organs with a mobile detector system. Manuskript eingereicht.

Hansch A, **Frey O**, Hilger I, Sauner D, Haas M, Schmidt D, Kurrat C, Gajda M, Malich A, Bräuer R, Kaiser WA (2004). Diagnosis of arthritis using near-infrared fluorochrome Cy5.5. *Invest Radiol*, Manuskript im Druck.

Frey O, Petrow PK, Gajda M, Siegmund K, Huehn J, Scheffold A, Hamann A, Radbruch A, Bräuer R. Role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: Aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4⁺CD25⁺ T cells. *Arthritis Res Ther* 2005, Manuskript im Druck.

Publizierte Abstracts

Frey O, Petrow PK, Scheffold A, Radbruch A, Bräuer R (2003). CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells in experimental arthritis. *Z Rheum* 62, I/36

Feuerer M, Siegmund K, **Frey O**, Bräuer R, Haubold U, Hamann A, Huehn J (2003). Characterization of the in vivo suppressive potential of alpha-E beta-7 expressing regulatory T cell subsets. *Z Rheum* 62, I/37

Hansch A, Sauner D, **Frey O**, Malich A, Bräuer R, Kaiser WA (2003). Diagnostik von Arthritis durch Nah-Infrarot-Fluoreszenz an einem Tiermodell. *Z Rheum* 62, I/80

Hansch A, **Frey O**, Sauner D, Haas M, Malich A, Bräuer R, Kaiser WA (2003). Diagnostik der Arthritis durch Autofluoreszenz. *Z Rheum* 62, I/80

Frey O, Petrow PK, Scheffold A, Radbruch A, Bräuer R (2003). CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells in experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 48, S35

Frey O, Petrow PK, Scheffold A, Radbruch A, Bräuer R (2003). CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells in experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 48, S235

Bräuer R, Petrow PK, Scheffold A, Radbruch A, **Frey O** (2003). Regulatory T cells in experimental arthritis. *Arthritis Res Ther* 2003 5, S40

Frey O, Petrow PK, Siegmund K, Huehn J, Scheffold A, Hamann A, Radbruch A, Bräuer R. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are key controllers of the severity of chronic arthritis. Keystone Symposia Regulatory/Suppressor T cells, Banff, Alberta, Kanada. 10-15. März 2004

Wissenschaftliche Vorträge

Antigen-induced Arthritis in T_h1/T_h2-deficient mice. Annual Workshop T_h1/T_h2-Research in Marburg (Juni 2002)

CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells in experimental arthritis. Annual Workshop T_h1/T_h2-Research in Marburg (Juni 2003)

CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells in experimental arthritis. 32. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie in Frankfurt am Main (5. September 2003)

Characterization of the in vivo suppressive potential of alpha-E beta-7 expressing regulatory T cell subsets. 32. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie in Frankfurt am Main (5. September 2003)

CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells in experimental arthritis. American College of Rheumatology, Basic Research Conference 2003 in Orlando, USA (23. Oktober 2003)

CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells in experimental arthritis. American College of Rheumatology, Annual Scientific Meeting 2003 in Orlando, USA (25. Oktober 2003)

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Rolf Bräuer für seine wissenschaftliche Betreuung.

Allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen aus der Arbeitsgruppe danke ich für ihre Unterstützung, für die kritische Diskussion der Daten sowie für die freundliche und aufgeschlossene Arbeitsatmosphäre.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei W. Kröber, C. Hüttich, H. Börner, R. Stöckigt und U. Griechen für ihre exzellente technische Assistenz bei der Durchführung der Experimente.

Kerstin Siegmund und Dr. Jochen Hühn (Experimentelle Rheumatologie, Charité Berlin) danke ich für die Kooperation und Mithilfe bei den gemeinsamen Migrations- und Transferexperimenten.

Bedanken möchte ich mich auch für die hervorragende Zusammenarbeit und stimulierende Diskussion mit Prof. Dr. A. Radbruch und Dr. Alexander Scheffold vom DRFZ Berlin sowie Prof. Dr. Alf Hamann (Experimentelle Rheumatologie, Charité Berlin).

Für ihre Hilfe bei den Zellsortierungen danke ich K. Raba und T. Kaiser vom DRFZ Berlin.

Bei meinen lieben Eltern Dr. Jürgen und Rosemarie Frey und bei meiner bezaubernden Lebensgefährtin Annett Frommann möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung sowie ihre Geduld mit mir bedanken.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben:

Prof. Dr. Rolf Bräuer

Dr. Peter K. Petrow

Dr. M. Gadjä

Dr. Jochen Hühn

Kerstin Siegmund,

- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe